

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

JC996 U.S. PTO  
09/988739  
11/20/01

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出 願 年 月 日  
Date of Application:

2000年11月22日

出 願 番 号  
Application Number:

特願2000-356652

出 願 人  
Applicant(s):

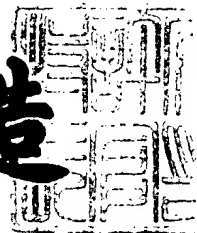
理化学研究所  
トヨタ自動車株式会社

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

2001年10月26日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



( Translation )

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

jc996 U.S. PTO  
09/988739  
11/20/01

This is to certify that the annexed is a true copy of  
the following application as filed with this Office.

Date of Application: November 22, 2000

Application Number: Japanese Patent Application  
No. 356652/2000

Applicant(s): -RIKEN  
-Toyota Jidosha Kabushiki Kaisha

October 26, 2001

Commissioner,  
Patent Office

Kozo OIKAWA (seal)

Certificate No. 2001-3093442

【書類名】 特許願

【整理番号】 RJH12-069

【提出日】 平成12年11月22日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明の名称】 環境ストレス応答性プロモーター

【請求項の数】 8

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台 3 - 1 - 1 理化学研究所 筑波  
    研究所内

    【氏名】 篠崎 一雄

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市高野台 3 - 1 - 1 理化学研究所 筑波  
    研究所内

    【氏名】 関 原明

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市二の宮 4 - 6 - 1 - 6 - 3 0 5

    【氏名】 楠城 時彦

【特許出願人】

    【識別番号】 000006792

    【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

    【識別番号】 000003207

    【氏名又は名称】 トヨタ自動車株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100091096

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100096183

【弁理士】

【氏名又は名称】 石井 貞次

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9503608

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 環境ストレス応答性プロモーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の(a)、(b)又は(c)のDNAを含む、環境ストレス応答性プロモーター。

(a) 配列番号 1 ～ 8 から選ばれるいずれかの塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号 1 ～ 8 から選ばれるいずれかの塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ環境ストレス応答性プロモーターとして機能するDNA

(c) 配列番号 1 ～ 8 から選ばれるいずれかの塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ環境ストレス応答性プロモーターとして機能するDNA

【請求項 2】 環境ストレスが低温ストレス、乾燥ストレス、塩ストレス及び強光ストレスからなる群から選択される少なくとも 1 つである請求項 1 記載のプロモーター。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 記載のプロモーターを含む発現ベクター。

【請求項 4】 請求項 3 記載の発現ベクターに、さらに任意の遺伝子が組み込まれた発現ベクター。

【請求項 5】 請求項 3 又は 4 記載の発現ベクターを含む形質転換体。

【請求項 6】 請求項 3 の発現ベクター又は請求項 4 記載の記載の組換えベクターを含むトランスジェニック植物。

【請求項 7】 植物が、植物体、植物器官、植物組織又は植物培養細胞である請求項 6 記載のトランスジェニック植物。

【請求項 8】 請求項 6 又は 7 記載のトランスジェニック植物を培養又は栽培することを特徴とするストレス耐性植物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、環境ストレス応答性プロモーターに関する。

## 【 0 0 0 2 】

## 【従来の技術】

遺伝子の配列決定プロジェクトによって、数種の生物について大量のゲノム配列及びcDNA配列が決定されており、植物モデルであるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) では、2つの染色体の完全なゲノム配列が決定されている (Lin, X. et al., (1999) *Nature* 402, 761-768.; Mayer, K. et al., (1999) *Nature* 402, 769-777.)。

## 【 0 0 0 3 】

EST (expressed sequence tag) プロジェクトも、発現遺伝子の発見に大いに貢献している (Hofte, H. et al., (1993) *Plant J.* 4, 1051-1061.; Newman, T. et al., (1994) *Plant Physiol.* 106, 1241-1255.; Cooke, R. et al., (1996) *Plant J.* 9, 101-124. Asamizu, E. et al., (2000) *DNA Res.* 7, 175-180.)。例えば、dbEST (National Center for Biotechnology Information (NCBI) の EST データベース) には部分cDNA配列が含まれており、全遺伝子の半分以上 (即ち、約28,000遺伝子) が再現されている (完全に配列決定されたシロイヌナズナの2番染色体の遺伝子含有量から推定 [Lin, X. et al., (1999) *Nature* 402, 761-768.] )。

## 【 0 0 0 4 】

近年、ゲノムスケールの遺伝子発現を分析するのにマイクロアレイ (DNAチップ) 技術が有用な手段となっている (Schena, M. et al., (1995) *Science* 270, 467-470.; Eisen, M. B. and Brown, P. O. (1999) *Methods Enzymol.* 303, 179-205.)。このDNAチップを用いる技術は、cDNA配列をスライドガラス上に1,000遺伝子/cm<sup>2</sup>以上の密度で配列させるものである。このように配列させたcDNA配列を、異なる細胞型又は組織型のRNAサンプルから調製した2色蛍光標識cDNAプローブ対に同時にハイブリダイズさせることで、遺伝子発現を直接かつ大量に比較分析することが可能となる。この技術は、最初、48個のシロイヌナズナ遺伝子を根及び苗条におけるディファレンシャル発現について分析することで実証された (Schena, M. et al., (1995) *Science* 270, 467-470.)。さらに、マイクロアレイは、熱ショック及びプロテインキナーゼC活性化に応答する新規な遺伝子を同定するため、ヒトcDNAライブラリーからランダムに採取した1,000個のクローンを

調査するのに使用されている (Schena, M. et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 10614-10619.)。

#### 【 0 0 0 5 】

一方、このDNAチップを用いる方法によって、各種の誘導条件下における炎症性疾患関連遺伝子の発現プロファイルの分析が行われている (Heller, R. A. et al., (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 2150-2155.)。さらに、マイクロアレイを用いて、6,000個を超えるコード配列からなる酵母ゲノムの動的発現についても分析が行われている (DeRisi, J.L. et al., (1997) Science 278, 680-686.; Wodicka, L. et al., (1997) Nature Biotechnol. 15, 1359-1367.)。

#### 【 0 0 0 6 】

しかしながら、植物の分野では、マイクロアレイ分析に対しては若干の報告がなされているに過ぎない (Schena, M. et al., (1995) Science 270, 467-470.; Ruan, Y. et al., (1998) Plant J. 15, 821-833.; Aharoni, A. et al., (2000) Plant Cell 12, 647-661.; Reymond, P. et al., (2000) Plant Cell 12, 707-719.)。

植物の生育は、乾燥、高塩濃度及び低温等の環境ストレスの影響を顕著に受ける。これらのストレスのうち乾燥又は水分欠乏が、植物の生育及び作物の生産にとって最も厳しい制限因子となる。乾燥ストレスは、植物に様々な生化学的及び生理学的な応答を引き起こす。

#### 【 0 0 0 7 】

植物は、これらのストレス条件下で生き抜くために、ストレスに対する応答性及び順応性を獲得する。近年、転写レベルで乾燥に応答する数種の遺伝子が記載されている (Bohnert, H.J. et al., (1995) Plant Cell 7, 1099-1111.; Ingram, J., and Bartels, D. (1996) Plant Mol. Biol. 47, 377-403.; Bray, E. A. (1997) Trends Plant Sci. 2, 48-54.; Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Plant Physiol. 115, 327-334. ; Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1999). Molecular responses to drought stress. Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants. Edited by Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. R. G. Landes Company. ;

Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 217-223.).

【 0 0 0 8 】

一方、遺伝子導入によって植物のストレス耐性を向上させるために、ストレス誘導性遺伝子を使用されている(Holmberg, N., and Bulow, L. (1998) *Trends Plant Sci.* 3, 61-66.; Bajaj, S. et al., (1999) *Mol. Breed.* 5, 493-503.). 高等植物のストレス耐性とストレス応答の分子機構をさらに解明するためだけでなく、遺伝子操作によって作物のストレス耐性を向上させるためにも、ストレス誘導性遺伝子の機能を分析することが重要である。

【 0 0 0 9 】

DRE/CRT(乾燥応答性エレメント/C-反復配列)は、乾燥、高塩分濃度及び低温ストレス応答性遺伝子のABA(アブシジン酸:植物ホルモンの一種で種子の休眠や環境ストレスのシグナル伝達因子として機能する。)に依存しない発現において重要なシス作動性エレメントとして同定されている(Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994) *Plant Cell* 6, 251-264.; Thomashow, M.F. et al., (1999) *Plant Mol. Biol.* 50, 571-599.; Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 217-223.). また、DRE/CRT応答性遺伝子発現に関与する転写因子(DREB/CBF)がクローニングされている(Stockinger, E.J. et al., (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1035-1040.; Liu, Q. et al., (1998) *Plant Cell* 10, 1391-1406.; Shinwari, Z.K. et al., (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 250, 161-170.; Gilmour, S.J. et al., (1998) *Plant J.* 16, 433-443.). DREB1/CBFは低温応答性遺伝子発現において機能すると考えられ、DREB2は乾燥応答性遺伝子発現に関与している。カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)35Sプロモーターの制御下でCBF1(DREB1B)cDNAを過剰発現するトランスジェニック・シロイヌナズナ植物では、凍結ストレスに対する強力な耐性が観察されている(Jaglo-ottosen, K.R. et al., (1998) *Science* 280, 104-106.).

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、CaMV 35Sプロモーター又はストレス誘導性rd29Aプロモーター



の制御下におけるトランスジェニック植物でのDREB1A(CBF3)cDNAの過剰発現によって、ストレス誘導性DREB1A標的遺伝子の強力な構成的発現が引き起こされ、凍結ストレス、乾燥ストレス及び塩ストレスに対する耐性が向上することを報告している(Liu, Q. et al., (1998) Plant Cell 10, 1391-1406.; Kasuga, M. et al., (1999) Nature Biotechnol. 17, 287-291.)。また、既に本発明者らは、rd29A/lti78/cor78、kin1、kin2/cor6.6、cor15a、rd17/cor47及びerd10等の6個のDREB1A標的遺伝子を同定している(Kasuga, M. et al., (1999) Nature Biotechnol. 17, 287-291.)。しかしながら、トランスジェニック植物におけるDREB1A cDNAの過剰発現が凍結、乾燥及び塩分に対するストレス耐性をどのように高めているのかは、十分には解明されていない。乾燥及び凍結耐性の分子機構を研究するためには、DREB1Aによって制御される遺伝子をより多く同定・分析することが重要である。

## 【 0 0 1 1 】

## 【発明が解決しようとする課題】

本発明は、環境ストレス応答性プロモーターを提供することを目的とする。

## 【 0 0 1 2 】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、cDNAマイクロアレイ分析を応用して、新規なDREB1A標的遺伝子を同定し、そのプロモーター領域を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の(a)、(b)又は(c)のDNAを含む、環境ストレス応答性プロモーターである。

## 【 0 0 1 3 】

(a) 配列番号1～8から選ばれるいずれかの塩基配列からなるDNA

(b) 配列番号1～8から選ばれるいずれかの塩基配列において1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ環境ストレス応答性プロモーターとして機能するDNA

(c) 配列番号1～8から選ばれるいずれかの塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ環境ストレス応答性プロモーターと

して機能するDNA

環境ストレスとしては、低温ストレス、乾燥ストレス、塩ストレス及び強光ストレスからなる群から選択される少なくとも1つが挙げられる。

【0014】

さらに、本発明は、前記プロモーターを含む発現ベクター、又は該発現ベクターに、さらに任意の遺伝子が組み込まれた発現ベクターである。

さらに、本発明は、前記発現ベクターを含む形質転換体である。

さらに、本発明は、前記発現ベクターを含むトランスジェニック植物（例えば、植物体、植物器官、植物組織又は植物培養細胞）である。

さらに、本発明は、前記トランスジェニック植物を培養又は栽培することを特徴とするストレス耐性植物の製造方法である。

以下、本発明を詳細に説明する。

【0015】

#### 【発明の実施の形態】

本発明者らは、乾燥処理植物及び低温処理植物等の条件の異なる植物から、ピオチン化CAPトラッパー法(Carninci, P. et al., (1996) Genomics, 37, 327-336.)によってシロイヌナズナの完全長cDNAライブラリーを構築し (Seki, M. et al., (1998) Plant J. 15, 707-720.)、ストレス誘導性遺伝子を含む約1,300個の完全長cDNAを用いてシロイヌナズナの完全長cDNAマイクロアレイを調製した。また、これらの乾燥・低温誘導性の完全長cDNAに加えて、ストレス応答性遺伝子の発現をコントロールする転写制御因子であるDREB1Aの標的となる遺伝子を用いてcDNAマイクロアレイを作成した。そして、乾燥ストレス及び低温ストレス下における遺伝子の発現パターンをモニターし、ストレス応答性遺伝子を網羅的に解析した。その結果、新規な環境ストレス応答性遺伝子、すなわち、44個の乾燥誘導性遺伝子及び19個の低温誘導性遺伝子を単離した。44個の乾燥誘導性遺伝子のうち30個、19個の低温誘導性遺伝子のうち10個が新規のストレス誘導性遺伝子であった。さらに、12個のストレス誘導性遺伝子がDREB1Aの標的遺伝子であり、そのうち6個が新規の遺伝子であることがわかった。そして、これらのそのプロモーター領域を単離することに成功したものである。

以上のように、完全長cDNAマイクロアレイは、シロイヌナズナの乾燥・低温ストレス誘導性遺伝子の発現様式の解析やストレス関連転写制御因子の標的遺伝子の解析にとって有効なツールである。

#### 【0016】

##### 1. プロモーターの単離

本発明のプロモーターは、低温、乾燥、高塩濃度などの環境ストレスにより発現されるストレス応答性タンパク質をコードする遺伝子上流に存在するシスエレメントであり、転写因子と結合して、その下流の遺伝子の転写を活性化する機能を有するものである。前記シスエレメントには、乾燥ストレス応答性エレメント(DRE; dehydration-responsive element)、アブシジン酸応答性エレメント(ABRE; abscisic acid responsive element)、低温ストレス応答性エレメントなどがあり、これらのエレメントに結合するタンパク質をコードする遺伝子として、DRE結合タンパク質1A遺伝子(DREB1A遺伝子ともいう)、DRE結合タンパク質1C遺伝子(DREB1C遺伝子ともいう)、DRE結合タンパク質2A遺伝子(DREB2A遺伝子ともいう)、及びDRE結合タンパク質2B遺伝子(DREB2B遺伝子ともいう)等が挙げられる。

#### 【0017】

本発明のプロモーターを単離するにあたり、まず、マイクロアレイを用いてストレス応答性遺伝子を単離する。マイクロアレイの作製には、シロイヌナズナ(Arabidopsis)の全長cDNAライブラリーから単離した遺伝子のほか、RD(Responsive to Dehydration)遺伝子、ERD(Early Responsive to Dehydration)遺伝子、kin1遺伝子、kin2遺伝子、cor15a遺伝子、また内部標準として $\alpha$ -tubulin遺伝子、さらにネガティブコントロールとしてマウスのニコチン酸アセチルコリンレセプターのエプシロンサブユニット(nAChRE)遺伝子及びマウスのグルココルチコイドレセプターの相同性遺伝子の計約1300のcDNAを用いることができる。

#### 【0018】

Kurabo製プラスミド調製装置を用いて抽出したプラスミドDNAをシーケンス解析に用いて、DNAシーケンサー(ABI PRISM 3700, PE Applied Biosystems, CA, USA)により配列を決定する。GenBank/EMBLデータベースをもとに、BLASTプログラムを用いて配列のホモロジー検索を行う。

次に、ポリAセレクション後、逆転写反応をおこない2本鎖DNAを合成し、cDNAをベクターに挿入する。

cDNAライブラリ作成用ベクターに挿入されたcDNAを、cDNAの両側のベクターの配列と相補的なプライマーを用いてPCR法により増幅する。ベクターとしては、 $\lambda$  ZAPII、 $\lambda$  PS等が挙げられる。

#### 【0019】

マイクロアレイは、通常の方法に従って作製することができ、特に限定されるものではない。例えば、gene tipマイクロアレイスタンプマシンGTMASS SYSTEM (Nippon Laser & Electronics Lab.製) を使って、上記PCR産物をマイクロタイタープレートからロードし、マイクロスライドガラスの上に所定間隔でスポットする。その後、非特異的なシグナルの発現を防ぐためにスライドをブロッキング・ソリューションに浸す。

#### 【0020】

植物材料としては野生型のほか、特定の遺伝子の破壊株等が挙げられるが、DREB1AのcDNAが導入されたトランスジェニック植物を用いることができる。植物種は、シロイヌナズナ、タバコ、イネ等が挙げられるが、シロイヌナズナが好ましい。

乾燥及び低温ストレス処理は公知方法の方法で行うことができる (Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994) Plant Cell 6, 251-264.)。

#### 【0021】

ストレス処理にさらした後は、植物体（野生型及びDREB1A過剰発現型形質転換体）をサンプリングし、液体窒素を用いて凍結保存する。野生型及びDREB1A過剰発現型形質転換体を、DREB1Aの標的遺伝子を同定するための実験に用いる。植物体から、公知方法又はキットを用いてmRNAを単離精製する。

標識用Cy3 dUTP又はCy5 dUTP (Amersham Pharmacia) の存在下でそれぞれのmRNAサンプルの逆転写を行い、ハイブリダイゼーションに用いる。

#### 【0022】

ハイブリダイゼーション後は、走査レーザー顕微鏡等を用いてマイクロアレイをスキャンする。マイクロアレイのデータ解析用プログラムとして、Imagene Ve

r 2.0 (BioDiscovery) と QuantArray (GSI Lumonics) 等を用いることができる。

スキャン後は、目的とする遺伝子をもつプラスミドを調製することにより、遺伝子が単離される。

#### 【 0 0 2 3 】

プロモーター領域の決定は、上記単離された遺伝子の塩基配列を解析し、データベース (GenBank/EMBL, ABRC) のゲノム情報をもとに、遺伝子解析用プログラムを用いて行われる。単離された遺伝子は、乾燥ストレス誘導性及び低温ストレス誘導性の両性質を有するもの、乾燥ストレス誘導性に特異的なもの、低温ストレス誘導性に特異的なものに分類することができる (図 4)。遺伝子解析用プログラムによれば、上記遺伝子の中から 8 種の遺伝子 (FL3-5A3, FL5-2H15, FL5-3M24, FL5-90, FL5-2I22, FL6-55, FL1-159, FL5-2D23) が同定される。これらの遺伝子のプロモーター領域を、それぞれ配列番号 1 ～ 8 に示す。

#### 【 0 0 2 4 】

但し、本発明のプロモーターが環境ストレス応答性プロモーターとして機能する限り、配列番号 1 ～ 8 から選ばれるいずれかの塩基配列において 1 又は複数個、好ましくは 1 又は数個 (例えば 1 ～ 10 個、1 ～ 5 個) の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列を有するものでもよい。さらに、配列番号 1 ～ 8 から選ばれるいずれかの塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ環境ストレス応答性プロモーターとして機能する DNA も、本発明のプロモーターに含まれる。

#### 【 0 0 2 5 】

一旦本発明のプロモーターの塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はクローニングされたプローブを鋳型とした PCR によって、あるいは該塩基配列を有する DNA 断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、本発明のプロモーターを得ることができる。さらに、部位特異的突然変異誘発法等によって本発明のプロモーターの変異型であって変異前のプロモーターと同等の機能を有するものを合成することもできる。

#### 【 0 0 2 6 】

なお、プロモーター配列に変異を導入するには、Kunkel法、Gapped duplex法等の公知の手法又はこれに準ずる方法を採用することができる。例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット（例えばMutant-K(TAKARA社製)やMutant-G(TAKARA社製)）などを用いて、あるいは、TAKARA社のLA PCR in vitro Mutagenesis シリーズキットを用いて変異の導入が行われる。

ここで、「環境ストレス応答性プロモーターとして機能する」とは、所定の環境ストレス条件下にプロモーターをさらしたときに、RNAポリメラーゼがプロモーターに結合し、転写開始させる機能をいう。

#### 【0027】

「環境ストレス」とは、一般には非生物学的ストレスを意味し、例えば乾燥ストレス、低温ストレス、高塩濃度ストレス、強光ストレス等をいう。「乾燥」とは水分が欠乏した状態を意味し、「低温」とはそれぞれの生物種の生活至適温度よりも低い温度にさらされた状態（例えばシロイヌナズナの場合-20～+21℃の温度を継続的に1時間～数週間さらすことをいう。また、「高塩濃度」とは、50mM～600mMの濃度のNaClを継続的に0.5時間～数週間処理したときの状態を意味する。

「強光ストレス」とは、光合成能を超える強光が植物に照射された状態を意味し、例えば5,000～10,000Lx以上の光が照射した場合が該当する。これらの環境ストレスは、1種類のものを負荷してもよく、複数種類のものを負荷してもよい。

#### 【0028】

本発明の植物プロモーターは、配列番号1～8のいずれかの塩基配列において、これらの3'末端に翻訳効率を上げる塩基配列などを付加したものや、プロモーター活性を失うことなく、その5'末端を欠失したものを含む。

さらに、本発明のプロモーターは、配列番号1～8のいずれかの塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ環境ストレス応答性プロモーターとして機能するDNAを含む。ここで、ストリンジェントな条件とは、ナトリウム濃度が25～500mM、好ましくは25～300mMであり、温度が42～68℃、好ましくは42～65℃である。より具体的には、5×SSC(83mM NaCl、83mMクエン酸ナトリウム)、温度42℃である。

#### 【0029】

## 2. 発現ベクターの構築

本発明の発現ベクターは、適当なベクターに本発明のプロモーターを連結(挿入)することにより得ることができる。本発明のプロモーターを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えばプラスミド、シャトルベクター、ヘルパープラスミドなどが挙げられる。

### 【0030】

プラスミド DNAとしては、大腸菌由来のプラスミド (例えばpBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、pBluescript等)、枯草菌由来のプラスミド (例えばpUB110、pTP5等)、酵母由来のプラスミド (例えばYEp13、YCp50等)などが挙げられ、ファージDNAとしてはλファージ (Charon4A、Charon21A、EMBL3、EMBL4、λgt10、λgt11、λZAP等) が挙げられる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルスなどの動物ウイルス、バキュロウイルスなどの昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

### 【0031】

ベクターに本発明のプロモーターを挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。

本発明においては、任意遺伝子を発現させるため、上記発現ベクターに、さらに当該任意遺伝子を挿入することができる。任意の遺伝子を挿入する手法は、ベクターにプロモーターを挿入する方法と同様である。任意の遺伝子は特に限定されるものではなく、例えば表2に示す遺伝子やそれ以外の既知の遺伝子等が挙げられる。

### 【0032】

本発明のプロモーターは、その3'末端にレポーター遺伝子、例えば、植物で広く用いられているGUS遺伝子を連結して用いれば、GUS活性を調べることでプロモーターの強さを容易に評価することができる。なお、レポーター遺伝子としては、GUS遺伝子以外にも、ルシフェラーゼ、グリーンフルオレセイントプロテインなども用いることができる。

このように、本発明においては、様々なベクターを用いることができる。さら

に、本発明のプロモーターに目的の任意遺伝子をセンス又はアンチセンス方向で接続したものを作製し、これをバイナリーベクターと呼ばれるpBI101(Clontech社)などのベクターに挿入することができる。

### 【0033】

#### 3. 形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の発現ベクターを宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、プロモーター又は目的遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではないが、植物が好ましい。宿主が植物である場合は、形質転換植物（トランスジェニック植物）は以下のようにして得ることができる。

### 【0034】

本発明において形質転換の対象となる植物は、植物体全体、植物器官(例えば葉、花卉、茎、根、種子等)、植物組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)又は植物培養細胞のいずれをも意味するものである。形質転換に用いられる植物としては、アブラナ科、イネ科、ナス科、マメ科等に属する植物（下記参照）が挙げられるが、これらの植物に限定されるものではない。

### 【0035】

アブラナ科：シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)

ナス科：タバコ (*Nicotiana tabacum*)

イネ科：トウモロコシ(*Zea mays*)、イネ(*Oryza sativa*)

マメ科：ダイズ(*Glycine max*)

上記組換えベクターは、通常の形質転換方法、例えば電気穿孔法（エレクトロポレーション法）、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法、PEG法等によって植物中に導入することができる。

### 【0036】

例えばエレクトロポレーション法を用いる場合は、パルスコントローラーを備えたエレクトロポレーション装置により、電圧500～1600V、25～1000  $\mu$ F、20～30msecの条件で処理し、遺伝子を宿主に導入する。

また、パーティクルガン法を用いる場合は、植物体、植物器官、植物組織自体



をそのまま使用してもよく、切片を調製した後に使用してもよく、プロトプラストを調製して使用してもよい。このように調製した試料を遺伝子導入装置（例えばBio-Rad社のPDS-1000/He等）を用いて処理することができる。処理条件は植物又は試料により異なるが、通常は1000～1800psi程度の圧力、5～6cm程度の距離で行う。

## 【 0 0 3 7 】

また、植物ウイルスをベクターとして利用することによって、目的遺伝子を植物体に導入することができる。利用可能な植物ウイルスとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルスが挙げられる。すなわち、まず、ウイルスゲノムを大腸菌由来のベクターなどに挿入して組換え体を調製した後、ウイルスのゲノム中に、これらの目的遺伝子を挿入する。このようにして修飾されたウイルスゲノムを制限酵素によって組換え体から切り出し、植物宿主に接種することによって、目的遺伝子を植物宿主に導入することができる。

## 【 0 0 3 8 】

アグロバクテリウムのTiプラスミドを利用する方法においては、アグロバクテリウム (*Agrobacterium*) 属に属する細菌が植物に感染すると、それが有するプラスミドDNAの一部を植物ゲノム中に移行させるという性質を利用して、目的遺伝子を植物宿主に導入する。アグロバクテリウム属に属する細菌のうちアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) は、植物に感染してクラウンゴールと呼ばれる腫瘍を形成し、また、アグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) は、植物に感染して毛状根を発生させる。これらは、感染の際にTiプラスミド又はRiプラスミドと呼ばれる各々の細菌中に存在するプラスミド上のT-DNA領域 (Transferred DNA) と呼ばれる領域が植物中に移行し、植物のゲノム中に組み込まれることに起因するものである。

## 【 0 0 3 9 】

Ti又はRiプラスミド上のT-DNA領域中に、植物ゲノム中に組み込みたいDNAを挿入しておけば、アグロバクテリウム属の細菌が植物宿主に感染する際に目的とするDNAを植物ゲノム中に組込むことができる。

形質転換の結果得られる腫瘍組織やシュート、毛状根などは、そのまま細胞培

養、組織培養又は器官培養に用いることが可能であり、また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモン（オーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、アブシジン酸、エチレン、ブラシノライド等）の投与などにより植物体に再生させることができる。

## 【 0 0 4 0 】

本発明のベクターは、上記植物宿主に導入するのみならず、大腸菌(*Escherichia coli*) 等のエッシェリヒア属、バチルス・ズブチリス(*Bacillus subtilis*)等のバチルス属、又はシュードモナス・プチダ(*Pseudomonas putida*)等のシュードモナス属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)等の酵母、COS細胞、CHO細胞等の動物細胞、あるいはSf9等の昆虫細胞などに導入して形質転換体を得ることもできる。大腸菌、酵母等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該細菌中で自律複製可能であると同時に、本発明のプロモーター、リボソーム結合配列、目的遺伝子、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

## 【 0 0 4 1 】

細菌への組換えベクターの導入方法は、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)などが用いられる。酵母への組換えベクターの導入方法は、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

## 【 0 0 4 2 】

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO細胞）、マウスL細胞などが用いられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞などが用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法などが挙げられる。

【 0 0 4 3 】

遺伝子が宿主に組み込まれたか否かの確認は、PCR法、サザンハイブリダイゼーション法、ノーザンハイブリダイゼーション法等により行うことができる。例えば、形質転換体からDNAを調製し、DNA特異的プライマーを設計してPCRを行う。PCRは、前記プラスミドを調製するために使用した条件と同様の条件で行われる。その後は、増幅産物についてアガロースゲル電気泳動、ポリアクリルアミドゲル電気泳動又はキャピラリー電気泳動等を行い、臭化エチジウム、SYBR Green液等により染色し、そして増幅産物を1本のバンドとして検出することにより、形質転換されたことを確認する。また、予め蛍光色素等により標識したプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物を検出することもできる。さらに、マイクロプレート等の固相に増幅産物を結合させ、蛍光又は酵素反応等により増幅産物を確認する方法も採用してもよい。

【 0 0 4 4 】

4. 植物の製造

本発明においては、上記形質転換植物細胞等から形質転換植物体に再生することができる。再生方法としては、カルス状の形質転換細胞をホルモンの種類、濃度を変えた培地へ移して培養し、不定胚を形成させ、完全な植物体を得る方法が採用される。使用する培地としては、LS培地、MS培地などが例示される。

本発明の「植物体を製造する方法」は、上記植物プロモーターを挿入した植物発現ベクターを宿主細胞に導入して形質転換植物細胞を得て、該形質転換植物細胞から形質転換植物体を再生し、得られた形質転換植物体から植物種子を得て、該植物種子から植物体を生産する工程を含む。

【 0 0 4 5 】

形質転換植物体から植物種子を得るには、例えば、形質転換植物体を発根培地から採取し、水を含んだ土を入れたポットに移植し、一定温度下で生育させて、花を形成させ、最終的に種子を形成させる。また、種子から植物体を生産するに

は、例えば、形質転換植物体上で形成された種子が成熟したところで、単離して、水を含んだ土に播種し、一定温度、照度下で生育させることにより、植物体を生産する。このようにして育種された植物は、導入されたプロモーターのストレス応答性に応じた環境ストレス耐性植物となる。

【 0 0 4 6 】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

〔実施例1〕 プロモーターの単離

1. 材料と方法

(1) Arabidopsis cDNAクローン

Arabidopsisの全長cDNAライブラリーから単離した遺伝子に加えて、RD (Responsive to Dehydration) 遺伝子、ERD (Early Responsive to Dehydration) 遺伝子、kin1遺伝子、kin2遺伝子、cor15a遺伝子、また内部標準として $\alpha$ -tubulin遺伝子、さらにネガティブコントロールとしてマウスのニコチン酸アセチルコリン受容体のエプシロンサブユニット (nAChRE) 遺伝子及びマウスのグルココルチコイド受容体の相同性遺伝子の計約1300のcDNAをマイクロアレイ作成に用いた。

【 0 0 4 7 】

陽性対照：乾燥誘導遺伝子（脱水応答性：rd、及び初期脱水応答遺伝子：erd）

内部標準： $\alpha$ -チューブリン遺伝子

陰性対照：非特異的ハイブリダイゼーションを評価するためにArabidopsisのデータベースにある任意の配列とは実質的にホモロジーを有さないニコチン性アセチルコリン受容体 $\epsilon$ サブユニット(nAChRE)遺伝子及びマウスグルココルチコイド受容体ホモログ遺伝子

【 0 0 4 8 】

(2) Arabidopsis 全長cDNAマイクロアレイ

ビオチニル化CAPトラッパー法を用いて、本発明者はArabidopsisの植物体から

、異なる条件（例えば、発芽から成熟種子までの種々の成長段階における乾燥処理、低温処理及び未処理）で全長cDNAライブラリーを構築した。全長cDNAライブラリーから、本発明者は、約1300の独立したArabidopsis全長cDNAを単離した。公知の手法（Eisen and Brown, 1999）に従って、PCRで増幅したcDNA断片をスライドガラス上の整列させた。本発明者は、以下の遺伝子を含む1300個のArabidopsisの全長cDNAを含有する全長cDNAマイクロアレイを調製した。

## 【0049】

(3) cDNAマイクロアレイを用いた乾燥誘導性遺伝子及び低温誘導性遺伝子の単離

乾燥処理植物、低温処理植物及びストレスを受けていない植物のCy3及びCy5蛍光標識プローブを混合し、cDNAマイクロアレイとハイブリダイズさせた。図1には、cDNAマイクロアレイの像を示す。一方のmRNAサンプルをCy3-dUTPで標識し、他方のmRNAサンプルをCy5-dUTPで標識するcDNAプローブ対の二重標識によって、マイクロアレイ上のDNAエレメントへの同時ハイブリダイゼーションが可能となり、2種の異なる条件間(即ち、ストレス有り又はストレス無し)における遺伝子発現の直接的な定量測定が容易になる。ハイブリダイズさせたマイクロアレイを、各DNAエレメントからのCy3及びCy5発光について2つの別個のレーザーチャネルによって走査した。次いで、各DNAエレメントの2つの蛍光シグナルの強度比を相対値として測定し、マイクロアレイ上のcDNAスポットで表される遺伝子のディファレンシャル発現の変化を判定した。本実施例では、分析を行う2種の実験条件下で発現レベルがほぼ同等である $\alpha$ -チューブリン遺伝子を内部対照遺伝子として使用した。

## 【0050】

図2には、乾燥誘導性遺伝子又は低温誘導性遺伝子の同定手順を示す。

1)乾燥処理又は低温処理を行った植物由来のmRNA及びストレスを受けていない野生型植物由来のmRNAを、それぞれCy3-標識cDNAプローブ及びCy5-標識cDNAプローブの調製に使用した。これらのcDNAプローブを混合し、cDNAマイクロアレイとハイブリダイズさせた。本実施例では、2種の条件下で発現レベルがほぼ同等である $\alpha$ -チューブリン遺伝子を内部対照遺伝子として使用した。発現比率(乾燥/ストレス無し、又は低温/ストレス無し)が $\alpha$ -チューブリンの2倍を超える遺伝

子を、乾燥誘導性遺伝子又は低温誘導性遺伝子とした（図 2）。

#### 【 0 0 5 1 】

2) 35S:DREB1Aトランスジェニック植物由来のmRNA及びストレスを受けていない野生型植物由来のmRNAを、それぞれCy3-標識cDNAプローブ及びCy5-標識cDNAプローブの調製に使用した。これらのcDNAプローブを混合し、cDNAマイクロアレイとハイブリダイズさせた。本実施例では、2種の条件下で発現レベルがほぼ同等である $\alpha$ -チューブリン遺伝子を内部対照遺伝子として使用した。35S:DREB1Aトランスジェニック植物における発現レベルが、ストレスを受けていない野生型植物における発現レベルの2倍を超える遺伝子を、DREB1A標的遺伝子とした（図 2）。

#### 【 0 0 5 2 】

乾燥処理又は低温処理を行った植物由来のmRNA及びストレスを受けていない野生型植物由来のmRNAを、それぞれCy3-標識cDNAプローブ及びCy5-標識cDNAプローブの調製に使用した。これらのcDNAプローブを混合し、cDNAマイクロアレイとハイブリダイズさせた。マイクロアレイ分析の再現性を評価するため、同様の実験を5回繰り返した。なお、同じmRNAサンプルを様々なマイクロアレイとハイブリダイズさせたところ、良好な相関関係が認められた。発現比率（乾燥／ストレス無し、又は低温／ストレス無し）が $\alpha$ -チューブリン遺伝子の2倍を超える遺伝子を、乾燥誘導性遺伝子又は低温誘導性遺伝子とした。

#### 【 0 0 5 3 】

##### (4) 配列の解析

遺伝子配列のホモロジー検索をおこなうため、Kurabo製プラスミド調製装置（NA 100）を用いて抽出したプラスミド DNAを配列解析に用いた。DNAシーケンサー（ABI PRISM 3700, PE Applied Biosystems, CA, USA）を用いてダイターミネーターサイクルシーケンス法によりDNA配列を決定した。GenBank/EMBLデータベースをもとに、BLASTプログラムを用いて配列のホモロジー検索を行った。

#### 【 0 0 5 4 】

##### (5) cDNAの増幅

cDNAライブラリ作成用ベクターとして、 $\lambda$  ZAPII (Carninci et al.1996) を用

いた。ライブラリー用のベクターに挿入されたcDNAを、cDNAの両側のベクターの配列と相補的なプライマーを用いてPCR法により増幅した。

プライマーの配列は以下の通りである。

【0055】

FL forward 1224 : 5' -CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGA (配列番号 9)

FL reverse 1233 : 5' -AGCGGATAACAATTCACACAGGA (配列番号 10)

100  $\mu$ l のPCR混合液 (0.25 mM dNTP, 0.2  $\mu$ M PCRプライマー, 1 X Ex Taq バッファー, 1.25 U Ex Taqポリメラーゼ (宝酒造製)) に、テンプレートとしてプラスミド (1-2 ng) を加えた。PCRは、最初に94°Cで3分反応させた後、続いて95°Cで1分、60°Cで30秒及び72°Cで3分のサイクルを35サイクル、最後に72°Cで3分の条件で行った。PCR産物をエタノール沈澱させた後、25  $\mu$ lの3 X SSCに溶かした。0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動により、得られたDNAの質とPCRの増幅効率を確認した。

【0056】

#### (6) cDNAマイクロアレイの作成

gene tipマイクロアレイスタンプマシンGTMASS SYSTEM (Nippon Laser & Electronics Lab.製) を使って、0.5  $\mu$ lのPCR産物 (100-500 ng/ml) を384穴のマイクロタイタープレートからロードし、6枚のポリ-L-リジンでコートしたマイクロスライドガラス (Matsunami製, S7444) の上に280  $\mu$ mの間隔で5nlずつスポットした。DNAをより等しくスポットするために、プリント後のスライドを、熱した蒸留水を入れたビーカー内で湿らした後、100°Cで3秒間乾燥させた。その後、スライドをスライドラックに置きスライドラックをガラスチャンバーに入れ、ブロッキング溶液 (15mlの1 Mナトリウムホウ酸塩 (pH8.0), 5.5g succinic無水化合物 (Wako), 及び335mlの1-メチル-2-ピロリドン (Wako) を含む) をガラスチャンバー注いだ。スライドラックを入れたガラスチャンバーを上下に5回振ってさらに15分間静かに震盪し、その後、熱湯を入れたガラスチャンバーにスライドラックを移して5回振った後、2分間静置した。さらにその後、スライドラックを95%エタノールを入れたガラスチャンバーに移して5回振った後、30分間遠心 (800rpm) した。

## 【0057】

## (7) 植物材料とRNAの単離

植物材料として、寒天培地に播種して3週間栽培した (Yamaguchi-Shinozakiと Shinozaki, 1994) 野生型及びカリフラワーモザイクウイルスの35SプロモーターにDREB1AのcDNA (Kasugaなど, 1999) をつないで導入したシロイヌナズナ (コロンビア種) の植物体を用いた。乾燥及び低温ストレス処理はYamaguchi-ShinozakiとShinozaki (1994) の方法で行った。すなわち、寒天培地から引き抜いた植物体をろ紙上に置き、22℃、相対湿度60%の条件で乾燥処理をおこなった。また、22℃で栽培した植物体を4℃に移すことにより低温処理をおこなった。

## 【0058】

野生型の植物体を2時間又は10時間のストレス処理にさらした後サンプリングし、液体窒素を用いて凍結保存した。また、カナマイシンを加えない寒天培地で栽培した野生型及びDREB1A過剰発現型形質転換体を、DREB1Aの標的遺伝子を同定するための実験に用いた。DREB1A過剰発現型形質転換体に対しては、ストレス処理を行わなかった。植物体から、ISOGEN (Nippon gene, Tokyo, Japan) を用いてトータルRNAを単離し、Oligotex-dT30 mRNA精製キット (Takara, Tokyo, Japan) を用いてmRNAを単離精製した。

## 【0059】

## (8) プローブの蛍光標識

Cy3 dUTP又はCy5 dUTP (Amersham Pharmacia) の存在下でそれぞれのmRNAサンプルの逆転写を行った。逆転写反応のバッファー (30  $\mu$ l) 組成は以下の通りである。



## 【0060】

---

poly (A) <sup>+</sup> RNA with 6 $\mu$ g oligo(dT) 18-mer	1 $\mu$ g
10 mM の DTT	
500 $\mu$ M の dATP, dCTP 及び dGTP	
200 $\mu$ M の dTTP	
100 $\mu$ M の Cy3 dUTP 又は Cy5 dUTP	
400 ユニットの SuperScript II 逆転写酵素(Life Technologies)	
1 X Superscript 第1鎖バッファー (Life Technologies)	

---

計 30  $\mu$ L

## 【0061】

42℃で1時間の反応を行った後、2つのサンプル (Cy3でラベルしたもの及びCy5でラベルしたもの) を混ぜ、15  $\mu$ lの0.1 M NaOHと1.5  $\mu$ lの20 mM EDTAを加えて70℃で10分間処理し、さらにその後15  $\mu$ lの0.1 M HClを加えた後、サンプルをMicro con 30 micro concentrator (Amicon) に移した。400  $\mu$ lのTEバッファーを加えてバッファー量が10~20  $\mu$ lになるまで遠心し、流出液を捨てた。400  $\mu$ lのTEバッファーと20  $\mu$ lの1mg/ml ヒトCot-1 DNA (Gibco BRL)を加えて再び遠心した。ラベリングの完了したサンプルを遠心によって回収し数  $\mu$ lの蒸留水を加えた。得られたプローブに2  $\mu$ lの10  $\mu$ g/ $\mu$ l 酵母 tRNA、2  $\mu$ lの1  $\mu$ g/ $\mu$ l pd (A) 12-18 (Amersham Pharmacia)、3.4mlの20 X SSC、及び0.6  $\mu$ lの10%SDSを加えた。さらに、サンプルを100℃で1分間変成処理し、室温に30分間置いた後ハイブリダイゼーションに用いた。

## 【0062】

## (9) マイクロアレイハイブリダイゼーション及びスキヤニング

プローブをbenchtop micro centrifugeを用いて1分間の高速遠心にかけた。泡の発生を避けるために、プローブをアレイの中央に置きその上にカバースリップをかぶせた。スライドガラス上に5  $\mu$ lの3 X SSCを4滴落として、チェンバーを適度な湿度に保ち、ハイブリダイゼーション中のプローブの乾燥を防いだ。スライドガラスをハイブリダイゼーション用のカセット (THC-1, BM機器) に入れて密封した後、65℃で12~16時間処理した。スライドガラスを取り出してスライドラックに置き、溶液 1 (2 X SSC, 0.1%SDS) 中でカバースリップを慎重にはずした

後ラックを振って洗浄し、ラックを溶液 2 (1 X SSC) 中に移して2分間洗浄した。さらにラックを溶液 3 (0.2 X SSC) に移して2分間放置し、遠心 (800rpm, 1min) にかけて乾燥させた。

走査レーザー顕微鏡 (ScanArray4000; GSI Lumonics, Watertown, MA) を用いて 1ピクセルあたり 10  $\mu$ m の解像度でマイクロアレイをスキャンした。マイクロアレイのデータ解析用プログラムとして、Image Ver 2.0 (BioDiscovery) と Quant Array (GSI Lumonics) を用いた。

【 0 0 6 3 】

#### (10) ノーザン解析

トータルRNAを用いてノーザン解析を行った (Yamaguchi-ShinozakiとShinozaki, 1994)。シロイヌナズナの全長cDNAライブラリーからPCR法によって単離したDNA断片をノーザンハイブリダイゼーションのプローブとして用いた。

【 0 0 6 4 】

#### (11) プロモーター領域の決定

データベース (GenBank/EMBL, ABRC) のシロイヌナズナのゲノム情報をもとに、遺伝子解析用プログラムBLASTを用いてプロモーター領域を解析した。

【 0 0 6 5 】

## 2. 結果

### (1) ストレス誘導性遺伝子

ストレスを受けていないシロイヌナズナ植物から単離したmRNAから、Cy5-dUTPの存在下で逆転写を行って蛍光標識cDNAを調製した。低温処理 (2時間) を行った植物から、Cy3-dUTPで標識した第2のプローブを調製した。両プローブを約1,300個のシロイヌナズナcDNAクローンを含むcDNAマイクロアレイへ同時にハイブリダイズさせた後、疑似カラー像を作成した (図1)。

【 0 0 6 6 】

低温ストレスによって誘導された遺伝子及び抑制された遺伝子は、それぞれ赤色及び緑色のシグナルで表される。両方の処理においてほぼ同レベルで発現した遺伝子は、黄色のシグナルとなる。各スポットの強度は、各遺伝子の発現量の絶対値に相当する。低温誘導性遺伝子 (rd29A) は赤色のシグナルであることが分か

る。α-チューブリン遺伝子(内部対照)は黄色シグナルであることが分かる。

cDNAマイクロアレイ分析によって合計44個の乾燥誘導性遺伝子を同定した(表1及び表2)。

【0067】

【表1】

	遺伝子数
乾燥誘導性遺伝子	44
新規乾燥誘導性遺伝子	30
低温誘導性遺伝子	19
新規低温誘導性遺伝子	10
DREB1A 標的遺伝子	12
新規 DREB1A 標的遺伝子	6

【0068】

【表2】

cDNAマイクロアレイによって同定された乾燥ストレス誘導性遺伝子、低温ストレス誘導性遺伝子及びDREB1A標的遺伝子						
遺伝子	受託番号	コードタンパク質 又は他の特徴	乾燥(2時間)		低温(2時間)	
			比	新規又は 既報	比	新規又は 既報
rd29A	D13044	親水性タンパク質	6.4	既報	5.1	既報
cor15A	U01377	-	5.0	既報	3.4	既報
kin2	X55053	-	5.8	既報	2.9	既報
erd10	D17714	グループII LEAタンパク質	6.0	既報	4.6	既報
kin1	X51474	-	2.9	既報	2.0	既報
rd17	AB004872	グループII LEAタンパク質	6.4	既報	4.6	既報
rd20	-	Ca結合EFハンドタンパク質	5.1	既報	n.d.	-
erd7	-	-	3.8	既報	2.3	既報
erd4	-	膜タンパク質	2.6	既報	2.2	既報
erd3	-	-	2.6	既報	n.d.	-
FL3-5B9	D17715	グループII LEAタンパク質(ERD14)	3.5	既報	1.5	-
FL3-3A1	D13042	チオールプロテアーゼ(RD19A)	2.8	既報	1.9	-
FL5-1F23	D32138	$\Delta^1$ -ピロリン-5-カルボキシレートシンテターゼ (AtP5CS)	2.8	既報	1.5	-
FL2-1F6	D01113	未同定種子タンパク質(RD22)	2.2	既報	1.1	-
FL3-5A3	AC006438	推定低温順化タンパク質	6.2	新規	2.3	新規
FL6-55	X91919	LEA76タイプ1タンパク質	2.9	新規	n.d.	-
FL5-77	AF121355	パーオキシレドキシシンTPX1	2.2	新規	1.8	-
FL3-5J1	AF057137	ガンマト/プラスト固有タンパク質2 (TIP2)	2.0	新規	1.2	-
FL6-1N11	M80587	非特異的脂質転移タンパク質(LTP1)	2.7	新規	1.3	-
FL5-95	-	イネ グリオキサラーゼホモログ	2.3	新規	2.8	新規
FL5-2H15	T45998(EST)	-	2.1	新規	n.d.	-
FL5-2O24	AC005770	推定水チャンネルタンパク質	2.4	新規	n.d.	-
FL5-2G21	AF034255	可逆的にグリコシル化された ポリペプチド-3(RGP)	2.1	新規	n.d.	-
FL5-1A9	-	ノジュリン様タンパク質ホモログ	2.9	新規	2.1	新規
FL5-94	X58107	エノラーゼ	2.0	新規	1.8	-
FL5-3J4	-	熱ショックタンパク質dnaJ ホモログ	2.8	新規	1.4	-
FL5-3M24	-	LEAタンパク質SAG21ホモログ	2.3	新規	2.2	新規
FL5-1O3	H37392(EST)	-	3.0	新規	n.d.	-
FL5-2I23	D14442	アスコルビン酸パーオキシダーゼ	2.1	新規	1.1	-
FL1-159	AB015088	HVA22 ホモログ	3.7	新規	3.8	新規
FL3-27	-	システインプロテイナーゼインヒビターホモログ	2.2	新規	n.d.	-
FL5-2I22	X80342	DC12ホモログ	2.6	新規	2.9	新規
FL5-1C20	-	主要ラテックスタンパク質タイプIIホモログ	2.0	新規	1.4	-
FL2-1H6	-	Brassica napus ジャスモン酸- 誘導性タンパク質ホモログ	2.4	新規	1.3	-
FL5-2E17	-	Brassica napus $\beta$ -グルコシダーゼホモログ	2.3	新規	1.1	-
FL3-3B1	AC008403	推定タンパク質	2.7	新規	1.4	-
FL5-3E18	M80587	アクアポリンホモログ	2.0	新規	1.1	-
FL5-3A15	X94248	フェリチン	2.8	新規	2.1	新規
FL2-56	AF104330	グリシン-富化タンパク質3 短イソフォーム(GRP35)	2.6	新規	1.4	-
FL5-2D23	-	T20517(EST)ホモログ	2.6	新規	1.3	-
FL3-2C6	Z35474	チオレドキシシン	2.3	新規	1.0	-
FL5-1P10	AC004044	推定フォトシステムI反応センター サブユニットD 前駆体	2.1	新規	1.4	-
FL2-6G7	U43147	カタラーゼ3(CAT3)	2.4	新規	1.2	-
FL2-1C1	Z9734	システインプロテイナーゼホモログ	3.0	新規	1.0	-
DREB1A	AB007787	EREBP/AP2タンパク質	n.d.	-	6.3	既報
FL2-5A4	AB010259	DEADボックス ATPase/RNA ヘリカーゼ タンパク質(DRH1)	n.d.	-	2.1	新規
FL5-90	AJ250341	$\beta$ -アミラーゼ	n.d.	-	4.4	新規
FL5-3P12	D63510	EXGT-A2	1.2	-	3.2	新規

【0069】

表2において、乾燥及び低温誘導性遺伝子並びにDREB1A標的遺伝子(35S:DREB1A)は、rd29、cor15A、kin2、erd10、kin1、rd17、erd4、FL3-5A3、FL5-77、FL5-94、FL3-27及びFL5-2I22である。乾燥及び低温誘導性遺伝子であるがDREB1A標的

遺伝子ではないものは、FL5-2024, FL5-1A9, FL5-3M24及びFL5-3A15である。乾燥特異的誘導性遺伝子は、rd20, FL6-55, FL5-3J4, FL2-56及びFL5-2D23である。低温特異的誘導性遺伝子はDREB1A及びFL5-90である。なお、これらの分類結果を図4に示す。

また、表2において、「コードタンパク質又は他の特徴」の欄には、配列のホモロジーから予想される遺伝子産物の推定機能を示す。

## 【 0 0 7 0 】

「乾燥」の欄における「比」は、以下の式から求めたものである（FI:蛍光強度）。

比 = [ (乾燥条件での各cDNAのFI) / (ストレスを負荷しない条件での各cDNAのFI) ] ÷ [ (乾燥条件でのα-チューブリンのFI) / (ストレスを負荷しない条件でのα-チューブリンのFI) ]

「低温」の欄における「比」は、以下の式から求めたものである（FI:蛍光強度）。

## 【 0 0 7 1 】

比 = [ (低温条件での各cDNAのFI) / (ストレスを負荷しない条件での各cDNAのFI) ] ÷ [ (低温条件でのα-チューブリンのFI) / (ストレスを負荷しない条件でのα-チューブリンのFI) ]

「35S:DREB1A」の欄における「比」は、以下の式から求めたものである（FI:蛍光強度）。

## 【 0 0 7 2 】

比 = [ (35S:DREB1A植物の各cDNAのFI) / (野生型植物の各cDNAのFI) ] ÷ [ (35S:DREB1A植物のα-チューブリンのFI) / (野生型植物のα-チューブリンのFI) ]

「乾燥」の欄において、「新規又は既報」は、遺伝子が乾燥誘導性遺伝子として報告されていなければ「新規」と、報告されていれば「既報」とした。「低温」の欄の低温誘導性遺伝子及び「35S:DREB1A」の欄のDREB1A標的遺伝子についても同様である。

## 【 0 0 7 3 】

表2に記載の遺伝子のうち14個 (cor15A, kin1, kin2, rd17, rd19A, rd20, r

d22, rd29A, erd3, erd4, erd7, erd10, erd14, AtP5CS) は、これまでに乾燥誘導性遺伝子として報告されているものである(Bohnert, H.J. et al., (1995) *Plant Cell* 7, 1099-1111.; Ingram, J., and Bartels, D. (1996) *Plant Mol. Biol.* 47, 377-403.; Bray, E. A. (1997) *Trends Plant Sci.* 2, 48-54.; Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) *Plant Physiol.* 115, 327-334.; Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1999). *Molecular responses to drought stress. Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants.* Edited by Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. R. G. Landes Company. ; Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 217-223.; Taji, T. et al., (1999) *Plant Cell Physiol.* 40, 119-123.; Takahashi, S. et al., (2000) *Plant Cell Physiol.* 41, 898-903.).

## 【 0 0 7 4 】

これらの結果から、本発明者らのcDNAマイクロアレイシステムが適切に機能してストレス誘導性遺伝子を見出したことが分かる。残りの30個の新規な乾燥誘導性遺伝子中には、推定低温順化タンパク質(受託番号AC006438)、LEA 76型1タンパク質(受託番号X91919)、非特異的脂質転移タンパク質(LTP1;受託番号M80567)、推定水チャネルタンパク質(受託番号AC005770)、T45998 EST、及びHVA22相同体(受託番号AB015098)と配列同一性を示すcDNA(FL3-5A3、FL6-55、FL5-1N11、FL5-2024、FL5-2H15及びFL1-159)を見出した。

## 【 0 0 7 5 】

また、cDNAマイクロアレイ分析によって合計19個の低温誘導性遺伝子を同定した(表1及び表2)。このうち9個は、rd29A、cor15a、kin1、kin2、rd17、erd10、erd7、erd4(Kiyosueら, 1994; Shinozaki及びYamaguchi-Shinozaki, 1997, 1999, 2000; Tajiら, 1999; Thomashow, 1999)の低温誘導性遺伝子並びにDREB1A(Liuら, 1998)として報告されているものである。

## 【 0 0 7 6 】

同様に、残りの10個の新規な低温誘導性遺伝子中には、推定低温順化タンパク質(受託番号AC006438)、フェリチン(受託番号X94248)、EXGT-A2(受託番号D63510

)、 $\beta$ -アミラーゼ(受託番号AJ250341)、DC 1.2相同体(受託番号X80342)、及びHV A22相同体(受託番号AB015098)と配列同一性を示すcDNA(FL3-5A3、FL5-3A15、FL5-3P12、FL5-90、FL5-2I22及びFL1-159)を見出し、また、ノジュリン様タンパク質(受託番号CAA22576)、イネ・グリオキサラーゼI(受託番号AB017042)及びLEAタンパク質相同体(SAG21;受託番号AF053065)と配列類似性を示すcDNA(FL5-1A9、FL5-95及びFL5-3M24)を見出した。

## 【 0 0 7 7 】

また、本発明者らは、完全長cDNAマイクロアレイを使用して、DREB1A転写因子によって制御されるストレス誘導性遺伝子を同定した。DREB1A標的遺伝子の同定手順を図2に示す。CaMV 35Sプロモーターの制御下でDREB1A cDNAを過剰発現するトランスジェニック・シロイヌナズナ植物(35S:DREB1Aトランスジェニック植物)から調製したmRNA及び野生型対照植物から調製したmRNAを、それぞれCy3-標識cDNAプローブ及びCy5-標識cDNAプローブの調製に使用した。これらのcDNAプローブを混合し、cDNAマイクロアレイとハイブリダイズさせた。35S:DREB1Aトランスジェニック植物における発現レベルが、野生型対照植物における発現レベルの2倍を超える遺伝子を、DREB1A標的遺伝子とした。

## 【 0 0 7 8 】

cDNAマイクロアレイ分析によって合計12個のDREB1A標的遺伝子を同定した(表1及び表2)。このうち6個は、rd29A/cor78、cor15a、kin1、kin2、rd17/cor47及びerd10のDREB1A標的遺伝子として報告されているものである(Kasugaら, 1999)。同様に、残りの6個の新規なDREB1A標的遺伝子中には、推定低温順化タンパク質(受託番号AC006438)、DC 1.2相同体(受託番号X80342)、エノラーゼ(受託番号X58107)及びペルオキシレドキシンTPX1(受託番号AF121355)と配列同一性を示すcDNA(FL3-5A3、FL5-2I22、FL5-94及びFL5-77)を見出し、また、ササゲ・システインプロテイナーゼ阻害剤(受託番号Z21954)と配列類似性を示すcDNA(FL3-27)及びerd4 cDNA(Kiyosueら, 1994; Tajiら, 1999)を見出した。

同定された乾燥誘導性遺伝子又は低温誘導性遺伝子を、以下の3つのグループに分類した(図4)。

## 【 0 0 7 9 】

- 1) 乾燥・低温誘導性遺伝子
- 2) 乾燥に特異的な誘導性遺伝子
- 3) 低温に特異的な誘導性遺伝子

以下の21個の遺伝子は、これら3つのグループへ分類するのが困難であったため、分類を行わなかった。

erd3、FL3-519、FL3-3A1、FL5-1F23、FL2-1F6、FL3-5J1、FL5-1N11、FL5-2H15、FL5-2G21、FL5-2I23、FL5-1C20、FL2-1H6、FL5-2E17、FL3-3B1、FL5-3E18、FL3-2C6、FL5-1P10、FL2-5G7、FL2-1C1、FL2-5A4、及びFL5-3P12。

#### 【 0 0 8 0 】

その結果、同定された遺伝子は、20個の乾燥・低温誘導性遺伝子、5個の乾燥特異的誘導性遺伝子、及び2個の低温特異的誘導性遺伝子に分類された。次に、乾燥・低温誘導性遺伝子をさらに2つのグループに分類した。

- 1) DREB1A標的遺伝子
- 2) DREB1A標的遺伝子以外

16個の乾燥・低温誘導性遺伝子は、12個のDREB1A標的遺伝子と4個のDREB1A標的遺伝子以外の遺伝子に分類された。。

#### 【 0 0 8 1 】

#### (2) RNAゲルブロット分析

cdNAマイクロアレイ分析では、最小限の労力で適切なデータを抽出することが重要である。本発明者らは、下記の方法によってcdNAマイクロアレイ分析の有効性を評価した。

#### 【 0 0 8 2 】

まず、発現比率(乾燥2時間/ストレス無し)が $\alpha$ -チューブリンの2倍を超える80個の遺伝子を同定した。80個の推定乾燥誘導性遺伝子についてノーザンブロット分析を行い、44個を実際の遺伝子として同定した。マイクロアレイの結果とノーザンブロットの結果の不一致は、1)遺伝子の低発現、2)高いバックグラウンド、3)cdNAスポット上の塵や引っ掻き傷、及び4)比活性の低い不良なcdNAプローブに起因するものであった。従って、上述の実験データに印をつけ、その半分を後続の分析から排除した。このようなデータ処理を行った後、cdNAマイクロアレ



イ分析に基づいて、44個の乾燥誘導性遺伝子、19個の低温誘導性遺伝子、及び12個のDREB1A標的遺伝子を最終的に同定した。次いで、RNAゲルブロット分析を行って、cDNAマイクロアレイを用いて得られた結果を確認した。マイクロアレイ分析によって得られた発現データの結果は、44個の乾燥誘導性遺伝子、19個の低温誘導性遺伝子、及び12個のDREB1A標的遺伝子が同定された点で、ノーザンブロット分析で得られた結果と一致した。

## 【 0 0 8 3 】

図 3 では、6 個の新規なDREB1A標的遺伝子(FL3-5A3、FL3-27、FL5-2I22、FL5-94、FL5-77及びerd4)についてマイクロアレイ分析の結果とノーザンブロット分析の結果とを比較した。6 個の遺伝子は全て、乾燥及び低温処理によって誘導され、ストレスを受けない条件下では35S:DREB1A植物中で過剰発現した。

## 【 0 0 8 4 】

乾燥処理を行った野生型植物(2 時間又は10時間乾燥(ろ紙上に放置))、低温処理を行った野生型植物(4℃にて2 時間又は10時間冷却)、又は未処理の35S:DR EB1Aトランスジェニック植物(35S:DREB1A対照)由来のサンプルをCy3-dUTPで蛍光標識し、未処理の野生型植物(対照)由来のサンプルをCy5-dUTPで標識した。cDNAマイクロアレイとハイブリダイズさせて走査を行い、相対発現比率を計算して図示した(図 3)。野生型植物の乾燥、低温処理及び35S:DREB1Aトランスジェニック植物に対するノーザンブロット分析像を示した。2 つのDREB1A標的遺伝子(FL3-5A3とFL3-27)の完全長cDNA配列は、それぞれGenBank, EMBL及びDDBJデータベースに受託番号AB044404及びAB044405で登録されている。

## 【 0 0 8 5 】

## (3) プロモーター領域の同定

プロモーター領域を同定した結果、本発明において得られた8種の遺伝子(FL3-5A3, FL5-2H15, FL5-3M24, FL5-90, FL5-2I22, FL6-55, FL1-159, FL5-2D23)のプロモーター領域が得られた。これらのプロモーターの配列を、それぞれ配列番号1～8に示す。

## 【 0 0 8 6 】

遺伝子名	プロモーター領域の配列
------	-------------

FL3-5A3 : 配列番号 1  
 FL5-2H15 : 配列番号 2  
 FL5-3M24 : 配列番号 3  
 FL5-90 : 配列番号 4  
 FL5-2I22 : 配列番号 5  
 FL6-55 : 配列番号 6  
 FL1-159 : 配列番号 7  
 FL5-2D23 : 配列番号 8

## 【 0 0 8 7 】

ところで、保存配列「PyACGTG(G or T)C」(Pyはピリミジン塩基すなわちCまたはTを示す。)は、多くのABA-応答性遺伝子においてABA-応答性エレメント (ABRE) として機能することが知られている (Ingram, J., and Bartels, D. (1996) *Plant Mol. Biol.* 47, 377-403.; Bray, E. A. (1997) *Trends Plant Sci.* 2, 48-54.; Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (1999). *Molecular responses to drought stress. Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants.* Edited by Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. R. G. Landes Company.)。また、9塩基の保存配列「TACCGACAT」(乾燥応答性エレメント : DRE) は、乾燥、低温及び高塩濃度のストレス条件下においてrd29A発現の誘導調節に必須であるが、ABA-応答性エレメント (ABRE) として機能しないことが知られている (Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. (1994) *Plant Cell* 6, 251-264.)。DRE及びDRE関連コアモチーフ (CCCA G) であるCRT又はLTREはまた、乾燥及び低温誘導性遺伝子 (例えばkin1, kin2, rd17/cor47, cor15a) の領域内に存在することが知られている (表3、Baker, S. S. et al., (1994) *Plant Mol. Biol.* 24, 701-713.; Wang, H. et al., (1995) *Plant Mol. Biol.* 28, 605-617.; Iwasaki, T. et al., (1997) *Plant Physiology* 115, 1287.)。

## 【 0 0 8 8 】

【表 3】

cDNAマイクロアレイ分析により同定されたDREB1A標的遺伝子のプロモーター領域に観察される  
ABRE、DRE及びCCGACコア配列<sup>a)</sup>

遺伝子	ABRE (PyACGTG(T/G)G)	DRE (TACCGACAT)	CCGACコアモチーフ (CCGAC)
rd29A	TACGTGTC(-45 to -38) <sup>b)</sup>	TACCGACAT(-148 to -140) TACCGACAT(-208 to -198)	AGCCGACAC(-111 to -103) GACCGACTA(-256 to -248)
cor15A	CACGTGGC(-132 to -125)	-	GGCCGACCT(-184 to -176) GGCCGACAT(-381 to -353) AACCGACAA(-416 to -424)
kin1	-	TACCGACAT(-120 to -112)	ATCCGACAT(-720 to -712)
kin2	CACGTGGC(-88 to -81)	TACCGACAT(-127 to -119)	CCCCGACGC(-403 to -395)
rd17	TACGTGTC(-920 to -913)	-	TACCGACTT(-162 to -154) AGCCGACCA(-967 to -959) GACCGACAT(-997 to -989)
erd10	CACGTGGC(-838 to -831)	-	GACCGACGT(-198 to -190) <sup>a)</sup> GACCGACCG(-202 to -194) <sup>a)</sup> CACCGACCG(-206 to -198) <sup>c)</sup> GACCGACAT(-999 to -991)
FL3-5A3	CACGTGGC(-74 to -67)	TACCGACAT(-415 to -407)	TGCCGACAT(-806 to -798)
FL3-27	-	TACCGACAT(-89 to -81)	-
FL5-2122	-	-	TACCGACTC(-191 to -183) TACCGACTA(-266 to -258) TGCCGACCT(-418 to -410) ACCCGACTA(-695 to -703) GACCGACGT(-788 to -778)
FL5-77	-	-	CCCCGACTA(-315 to -307)
FL5-94	-	-	TACCGACTA(-190 to -198) TTCCGACTA(-260 to -268) ATCCGACGC(-630 to -622)

【 0 0 8 9 】

表 3 において、a)、b)及びc)の意味は、それぞれ以下の通りである。

a): ABRE、DRE及びCCGACコア配列は、単離された最も長いcDNAの5' 末端から1000bp上流に観察された配列である。

b): 括弧内の数字は、単離されたcDNAの5' 末端で始まるヌクレオチドを示す。マイナスの表示は、ヌクレオチドが推定転写開始部位の5' 末端よりも上流に存在することを意味する。

c): CCGACコアモチーフを含むこれら9塩基の配列は、互いにオーバーラップしている。

【 0 0 9 0 】

本発明者は、12個のDREB1A標的遺伝子をcDNAマイクロアレイ解析により同定した。9bpのDRE配列は、FL3-5A3及びFL3-27のcDNAに対応する遺伝子のプロモーター領域に観察される(表 3)。コアとなるCCGAC配列は、FL3-5A3、FL5-2122、FL5-77及びFL5-94のcDNAに対応する遺伝子のプロモーター領域において観察される

(表 3)。ほとんどの乾燥及び低温誘導性遺伝子は、DREB1A 標的遺伝子であり、DRE/CRT シス作用性エレメントをプロモーター中に含んでいる (表 3 及び図 4)。ABRE 配列 (「PyACGTG(G or T)C」) は、同定した 12 個の DREB1A 標的遺伝子のうち 6 個のプロモーター領域において観察された (表 3)。このことは、多くの乾燥及び低温誘導性遺伝子が、ABA-依存性及び ABA-独立の経路の両者によって調節されていることを示すものである。しかしながら、いくつかの乾燥及び低温誘導性遺伝子 (FL5-3M24, FL5-3A15, FL5-1A9, FL5-2024) は、35S:DREB1A トランスジェニック植物において増加しなかった (図 4)。このことは、これらの遺伝子が DREB1A 標的遺伝子ではないことを示すものである。コア配列「CCGAC」は、FL5-3M24 の cDNA の 5' 末端側の 2,000bp 上流領域において観察されなかった。この結果は、乾燥及び低温誘導性遺伝子発現に関与する新規シス作用性エレメントが、FL5-3M24 遺伝子プロモーター領域に存在する可能性を示すものである。

【 0 0 9 1 】

【発明の効果】

本発明により、ストレス応答性プロモーターが提供される。本発明のプロモーターは、環境ストレス耐性植物の分子育種に使用できる点で有用である。

【 0 0 9 2 】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

TOYOTA MOTOR CORPORATION

<120> A STRESS-RESPONSIVE PROMOTER

<130> RJH12-069

<140>

<141>

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2072

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

tgggcttttg atccacatga cgatcatata gtctttcct tcaacacaaa acacttgaag 60
tgtatcttat caactaaact ctattccagc aaaattattt caaaattaga tatatgggag 120
aatttttaca ggccattcta gattttcatt aacgctgtga tttatccgtt aataagtacg 180
attaagagta aaacgacgtc gtttgcaatt gaaacaaaaa tccccaattc agaaataaga 240
aaccctagat cctcaaatct cttcttcttt tcttcttcga attcactcct gtattttgaa 300
atcaaagtga attgcaaggc acaaagttca tgctttaaag cactgcaa at ggccaagtca 360
tgatttatat ggcatTTTTc ctgtttttgt ttcaattgca aacgacgtcg ttttgctctt 420
aaacggctctc attaacggat aaatcacatc ttctaattgc tctgtttatt cagttgatgt 480
tgtgactaat ttggctctgt caacgaaagt tagtgatttt atctgaagtc aacacgtaat 540
tgatgatttt aatcacaaag tacaaagttt atgtttaaag caccacaa at tgcgaagtcg 600
tgatttaaat gacatttttc ccgttctggt taaactaagt ttctattatt taatatggat 660
attgtggagc gtagtgtcag cactcagcag cttatttaac gtgatactct ttaaccgagt 720
aacaactagt gaggtcatat tcaggaccga tccaacaata ttgagggttt tactccaagt 780
aaaatttttag ttttattttt aattatcata aacgacataa atataatatg gaaagatcac 840
aaatactgat taaaaactaa aatcatcaaa acgaaaaaga aaaaagaaaa aattgggttc 900
aactctcatg agttattaaa cattttaggt tttaggctta aatctttaaa aaaaatcaga 960
actgaaaaac gaaaaattct aattttattt tggactctga ttcatagctt atgtcgtta 1020
tgtagttatg ctagggatga atctgtattt cgttaccgta atgagagttc gatactctct 1080

```

tacttggttac gattctggag catgttacat ttttttcttt ccgtcaacaa caactttaat 1140  
 atggtaaaac aaaatttatt tttatttggc tggctctact caagacaaat cttctgccga 1200  
 catcacataa tcatattaaa aaccataact tctgccactc tgtttttttt tttttttgta 1260  
 accattaact gattggattt tgatecatct catctgattt tttagctcaa caatttactt 1320  
 gcacattttc tatttggttt tatttatact tagttacata tatgattatc gaactagtat 1380  
 ctctttataa ttaagtattt ttctattttt ttttaattta gatttttgtg aattcattta 1440  
 cagtagaaaa ctgtaaaacc atatggtcta attatagaat gaaaacttca acgaatccat 1500  
 acaacttatt ggctaaatat aataaatctg cttgaagcat attgttatta tttagttgga 1560  
 tttgacgac tctgacttta atgtataccg acatacccta tgatttagat gttgattttt 1620  
 cccattctta atatatccat gttaagagat tccaccataa catatcta at tatttgcatt 1680  
 gtaataaata ttatcattaa aaaaaaatac aactggacag ctggctcgtc ccattgtttc 1740  
 ttacgtccac caattacatt tgttaaagca aacttattag aacgttcatg tgtgagaagt 1800  
 tgggtcgcac atgtgtctaa ggtctatgtc agaaatcgga ttagcttatt aagtaaacta 1860  
 tactatatca ttgttaatat agataaaata tctagttcgt ccaaattaaa ctattttcat 1920  
 aactgccacg tggcgtaaac gtatccatcg agtcacttgt aatatcttta taaccaagt 1980  
 cttccaacac attcatcacc atctatctac tctttactct cttctcttct cacatcaatt 2040  
 attcatagtt ctctcttctc cggcaagaaa ag 2072

<210> 2

<211> 2000

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 2

ctcctgtttc atgatcatat ataaaaggaa agagattgat tcagctaate aaattcataa 60  
 acatggataa gatatacaca actctaaacc tagctcaaac tatgaacaat agaggataac 120  
 cacttgaaac ctaattttta tcagaagatt ttagtacttg tgctgcttat tcaaaattcc 180  
 tttgccccaa aaaaaaaagt ttgacttacc ttttgaaaga cgaacgtatc cactatggaa 240  
 caatctttcg taatctcact ttctagtttg gtatttaaaa aaccctaaat ttgattgtca 300

aattaaatac aataagagat tcctaaaccc agaattcaat tgcgaaatca aacagagacg 360  
atacagagag agcgagagag cgagagagag agagtgattt acgtgagaac gaatcggata 420  
aacggaaatt tccagaagcc ggatgagttt cccgctattg tgatgagtaa caaaacaaat 480  
tcgggagttg tctatttaaat acttatcaat agcccatgaa cgcagagacg tatggacgcg 540  
agaatcgta gtacgtgaca cgtgtaaacc agtgacgtca ccgctctcgt cacaacccg 600  
ctagtattgt cctcttctat ttatctcac acaatcatgt taggttatca tagtaccact 660  
aaacatttat gtgagaatgg atggatatta gacaaccgac gacaaataaa acaacaaaa 720  
gtagatagac gaccataaat taaactataa acgaagattg agggaaaaaa tcattggttt 780  
agattttcga acaaatatcg tgaaaagttt ttcacttctg agtttttgta attaatggtg 840  
tatgaaaaat cattggtttg tttagttgaa ttaaatttca gtaaacggtt tagagtatga 900  
accactcaa taaagatttg actgccaagc gttactggtg tctggtggat tgaatagtta 960  
agagtataag gtttgggcca ttatgtggtt ttatttaaag ttgaaggtct catttattaa 1020  
ttccttagag ctgatggcta atgtacaacg aatttgattc aggagtaaga taaacggtac 1080  
acccaaacac gcgacgcgag cgaagaagac gatgacgaac aaggagaaag ctgagagag 1140  
aaggagaaaa agaatgcagg agatctctct ccttcgaact attccttact ctgaccacca 1200  
taggtatgaa gagacctaatt ttgtccaatt gtttcggctt ctttgatatcc taagatctat 1260  
catcatttac tctgcgagat tctcaatttc acagcattcg atgtgttaat ctctaatttc 1320  
acttgcttaa atccatttct tagtgtcgct tacagtgtt gatgagtttc tatttttctc 1380  
tatttgggag ttggagactg aattggtatt gttgttggtt cttacagatt tgtgtttcac 1440  
taaaccaaaa gaatttagag aaattgaaaa tgatgaagta tgtgtctctc aagccctctt 1500  
tttgaatttg acttgtcatt aggcgtcaaa tgatttttta ggtggtggtc ttgtgaaaat 1560  
gtagcagtag tgactggttc aaaccgcggg attggattcg agattgcaag acagcttgcg 1620  
gttcacggat tgacggttgt tcttacagct agaaacgtga atgctggtct tgaagcagtt 1680  
aaatctttga ggcaccaaga agaaggtctc aaggtttatt ttcactcaact tgatgtcaca 1740  
gactcttcgt cgattagaga gtttggttgc tggcttaagc aaacatttgg aggttttagat 1800  
attctcgtaa gatccttacc gattcgtaat cttggaggat agttctaag ttttcttaga 1860  
tttgaattac atgcatttgt gttgctatgt ttttcaggtg aataatgcag gtgttaacta 1920  
caatctcggc tcagataata cggttgaatt tgctgaaaca gttatatcta ctaactacca 1980  
aggaacaaaa aacatgacaa 2000

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 2000

&lt;212&gt; DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;400&gt; 3

catataccaa cgcctaaca ttacagcctg tccccatccc ctatctttat ttttcttttt 60  
ggctcattta gcttcaactt tttttaatag gtgtgattag aacatactaa aaaaaacata 120  
tgttttaact tatattatat gaataaagtg ttgtttttaa tagtttatat ttctattaca 180  
agtacaatat ataggatatt ttggttaaca attttaaatt taaaagatat tgtgagtaca 240  
aatcattaag cttaacacaa atgttcattg ctctttaatt cttacaatcg gaaaatttgg 300  
acaaaaaatc tagactaatc tccaaaacat tgtgaaaaat tggggggttt ttttatcatt 360  
taaattgtct atagtgggtca atcattatta aaaaaaattg tttttgttg aaattttaaa 420  
ttataaaaaa aaaacacgtt tatacataaa atgcaaaaac ttttcttaa ccaaattaca 480  
gagaaaggct atcaccatcc ttgtcttgat gccaccaca cttgtaatcc caaaatacat 540  
acttaacta tactatacta acatgaattg gttatacgat tatctatcta gttagctaca 600  
taattcatat aattagtttt ttaaaatata cttatgtaat gatagtaact aaaaaatata 660  
ctatctcgag aaatccaacc aaaatgctat gatagtatat aaaataaaat gaaagaaaga 720  
ggaaccaagt tgtgaaacca tttaccaaga agaagaaga aaaaacaaga tggtcgagtc 780  
tcgtgatagt atgaagctgg ggccgaaacc acgaatcaaa gaaccatttg acgatgcaag 840  
tggtcatcga taaccaatca atagaaactc caccgcctca aaatatcata gtgctattta 900  
atttttcata ctatcattta ttgtaggcta taacatattt ttgtattgta gatggacggc 960  
tagtacacgc aagttagtca ataaactttt aacaaatggc atcttgacat gcttaaacac 1020  
attttataat tcgaacctca ctttgcctac tttacacacg tctacttata gtagatgagc 1080  
atcaatcatt gaaccgttcg tataatacaa tttttttttt gtaatacggtt ataattagaa 1140  
agtaatggaa aataagttga aacacaaatt ttcaacggtt ttactaagat ttaattttac 1200  
aattttcaaa atataaccga attatttttaa tcgtatttaa tttataatta attttctaaa 1260  
aaaaaacaca gattaaaaaa atatatttaa actaatcata aatatattaa tttttgtaat 1320



ttatatTTTT ttataacttt aaactaataa tattcaatta tttatcttaa agtttacaaa 1380  
 ttatcaataa taactaataa ataatgcata aaaacttttt aaaaattaac tttttgaaac 1440  
 aaatTTTTTT ctaaaaaatt aaataataaa gaacagaaaa aatattattc aactaaaaat 1500  
 attggataat aactctgaaa gtttgcattt ttcaaataaa tcattgattt tttttgtttg 1560  
 acataaaaca ttaatttccc cttgtaaatc acacatttaa aatctaacta tatttaaaca 1620  
 aaaaaaaaaa gtccaatttt gactttaatt atataaaaaa agcaaagcta attatgggtc 1680  
 aaaagactca aaggccagaa ttgacgcagc cgtttatgag aagtgagaag acaatttcgg 1740  
 agtcacttcc tttatttccct ctcttccctc actctctcct atataaacct tcctctcctc 1800  
 ttctctcttt ctcatctctt caaaccattt tcgaaagcct tgagagagag aacacagacg 1860  
 ataccaactt tcttcaatct cgttgccgca gtataattat ctcatctcct ggatatactt 1920  
 ctcttcttgc ggcggcgaca agaagctaca agaataaaaa gtctgttttc tctcttttca 1980  
 agaaaccact tacttcgaaa 2000

<210> 4

<211> 2000

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 4

agcaagtagg ttacgtggaa ggaagatatc aacgcacaaa aagagaaaca ctcaacgtta 60  
 agggaacca cacaatctt ggatttttgc tgatgcagtg tgtgaaaaca ggtccacag 120  
 ctttgtactt ttttcatcat cgggtctaca taaagctcaa gtctttccat ggacagagat 180  
 aagcaagaaa aagtattaac attgttcacc tcaaaataat ttaggaaaat gacaatgaga 240  
 tttttacctc aaaagccaaa atcaacatct acccatctt tcaactcgtca caatcatgag 300  
 tttcttaca tgcttacctt agagtttaga gacatattct cacaaaaaaa gcttgtgtct 360  
 atttcaaatt cttgaccgta gatgtcaca catgcatata tcattgaaaa cagagcaaca 420  
 caggaaacca agcatatgta tctagatata cttagcaaga cataactata gtctttgaat 480  
 caacataggg attaatagata gagaatgagg aagctcaaga ttttatactc agtttcttac 540  
 aaaacaaatt tctctctaac tgcaaaaaca ccaattagga tttgaagagc gtacctgttt 600

gagtcaatgt ccaatgtcgt cccccgcct tctacatttc ttagcctgct gaataaaaagc 660  
 acaagccaaa atgagaaggt gccaaaggcg ataaggatca atttctacca ttcaaaaaaac 720  
 taatgggtgag aattagaaac gagagaaaac tacttggtga ggaaatagcc aaaagcgcaa 780  
 tcttcgtcac ctgaataaag accaaaccgt cactttcaat gagtcagcaa gaaaaagaga 840  
 gagagagaga gagagattct ctataacatt tgagtcgaca tggattctaa tgcatacaaa 900  
 gtcattctcca ataaacaaac acttgaaact cacatggcta atagaacaag atcaaagcct 960  
 taagtattaa gcattacaga cactactggc taacttttga cacatgttct taagtaacat 1020  
 agtatcaata tccgtgaatc acatcgaaca cacacaacaa gggcttaatg catcaaagtc 1080  
 ctgttatttc catataacaa catatttcat ttacaaacag aatgcagcat tcaggcagtc 1140  
 caaatggaaa ggttgacaaa aaaatataat cttgtaactc tacatatatg gcagaatgta 1200  
 ataaccaggc aagaaaaaaa cagaataaac agatcaatga gtatgatata aaaaaaagtc 1260  
 acaaagaatg tgccacagtg aacaagaggg ccatgagaag aaattttcaa agaaaatatt 1320  
 agcattgtta gaattttttg ggtcaatgga tctgtcagct gcttagttgg aaaacacaaa 1380  
 tcttacagga aggaaagtcc aagaaaaaga aaataagcaa agttaatagc caccacaaga 1440  
 aatttcatac agaaataatt aaatcgttgc acttatcttc ttattcaaac taaaatcaag 1500  
 agaacttaat aattttcagc cacacgaacc atgtgttcaa agccaaaggt gagaagccaa 1560  
 aattatcagc ttatctccat taacaaggga aaagcaagac tagatttaag agttctctgt 1620  
 aactaaaaac tgcaggagtg agtaagtaaa taattacca acaggaaaac aaaactcaat 1680  
 tatctatagc tgaatacaca tgtaaatgag aatttattaa ctaaaacatc ttcctttgta 1740  
 actgatgtga catttacaat ttttcatttt gaggtgtaag aaccgtgtga caagtgaaaa 1800  
 ggttaaaaata agcaaccttt gtgatatttt ctctccactt tttgaaattg ggtctccaaa 1860  
 ccacagccaa tcaatatctt ttataaatac aaacacacaa acagcatctt tctctcaaac 1920  
 acaaacatat cttctatcaa acaccaacag ctctattctc tacctcattt ctcatcataa 1980  
 caaagagaga gaaaaaaact 2000

<210> 5

<211> 2000

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;400&gt; 5

tttctggatc acgttcacat gccgataatt attgttaagt tgtttgcata ttttattatg 60  
 tgccttgttt gtgggatttt cgctaatttc ttttctcggt ttttcgttct cctcttcctt 120  
 caattatttt ctcaacttcc tattcgacca aagcattaat tctacacacg acagtaaagg 180  
 acccactcaa acaataatta gttttcaact ctttcagaat atatttttagt gacactaaaa 240  
 tagcatatca taaacacaac agaggccaac gactctgaat gatccgtacc gcagtggaaa 300  
 taacagtcgg gttatgtcgg taggctatat aagccactac tttcatttca atttctcaac 360  
 tttgttgtag ttagttcgta tcctatcagt ttatcatcac ttttaattgt taccatatag 420  
 tatctgtaaa aactaattaa tatttatgaa tcatgctcat attttcaaatt cttagagcta 480  
 ctcaacagaa cacacacaca tacagtcaaa attttatact acataatttt tgttttaagt 540  
 ttacagttat aaaccaaaaca aatcacctca caaaagtata tagttatacc aaaccaagca 600  
 cctcataaat gaaaacaaaa ttaaaaataa taatatatat aataagaaat attcatcaat 660  
 actaacgttc aatttttagta aattggcaaa aataaaatat tagtatcact tccagagatt 720  
 acattattat ttgggtgaatt tggcaaaaat aaaatatattc gttgggtggat gctttgctgg 780  
 gacgactttg tttattaccg tcatattgta gtaacctaat tttattacct aacattcatt 840  
 tgaacattaa aaacattaat gtcatttgat tggaagagtt tattaatgac cattatttcc 900  
 ttatttccaa acctaatataa cccattattt ccttatatta aattatggct tgattgggtgc 960  
 aatttctttc tagctctttc tgtttcggtc ttgattcgaa taaaaacgac aaatgttattc 1020  
 tctaccgta tccgattatg tttaatatat tatgcattga tatttcacgc tacgatctgg 1080  
 accgacgttt agtgtggacc ctgtcacgag ttttatctat gacggaccaa aagaaaaact 1140  
 aattaaagca gaatatcaaa gttagtcggg taagttccaa ctaataaccg agccctgttt 1200  
 ggctttgagc attagtagta atcaaagtaa acatatgata gaaaagttat tataatctat 1260  
 tatatacaga ttaatatgta cgattccaga ttctatttat gtttctcgta tgtaaaacat 1320  
 ataatgtgaa cctacttaaa ctatactaag actattagtt tggtttcaaa ttagattaat 1380  
 tagtttaacc aaactgaaca tatccctaga ttgtaaaagt ctaatatatc cactaattat 1440  
 ttttgcttgc cgacctctaa tccacaactt tttgtttttc catttccact gattttcaac 1500  
 attccaccgg gtgttaccaa cagtaacata catacagtga attttttcaa cactccaccg 1560  
 catgttacca atagtagcaa aaccctcgac aaaaatttgt accgactata aatattcaac 1620

tccaactctt tcctctccac acactcaa atctctccaa cactaaaata attgtaccga 1680  
 ctctctctct ctctctctcc gtaacaaaa aatcaccaat ggcaaaacaa tatctctttg 1740  
 tactcctctc aatctcctat ctcttatcac tggagctcac ggcgggccacc gcagcctcac 1800  
 agaccggagc ttccaaaaaa gccataaact tcatccaatc ttcttgcaaa accaccacat 1860  
 accctgcctt atgtgtccac tcactctccg tctacgcaaa cgacatccaa acaagcccta 1920  
 aacgttttagc tgagaccgct atagccgtga cactaagccg agcccaatcc acgaagctct 1980  
 tcgtctcgcg tctaacacgt 2000

<210> 6

<211> 2000

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 6

attatatcta taataacatg attctatttc aatcgagtat gtaaaaaaag taaaaatttg 60  
 atcgattaat catgtagtaa tctcgtgttt tttccaaca aataattgat taaaagttaa 120  
 aaacatatca taaatcaaaa ccgaatgagt aatccggatt gagtctagaa ttacaagtta 180  
 agttatctgt catacgggtg taatctcata tttttgtag aatccttaag agttgagaac 240  
 tttcaagaac agttaagttt aataatattt taatctttgt ataagagatt tcttcattct 300  
 tctaaaacca caacaccttg tgatcgacaa ttcatacgta catatttgag atttaatttg 360  
 ttttccttat ataagaaatc aataatctta ttgtatatga ctaatttatt atataaaaac 420  
 cttactagg gggtatataa gacacgtaga aatgtctcca acatacagta ctataccaca 480  
 aaattcagaa atttgaacaa ccaaagcaat cagaaaacaa tattcatttt tgttttattg 540  
 gaaaagattg agccaatatt tcttaaataa ctctttttta gataatcttg gaaccgggct 600  
 tgttcgagcg ggctgtgcca gccgggctgc tagggctgtt ggtagccgga ctcatcccg 660  
 gagtgttctt cacagcatcg gctgctcctt gtgccatgtt cttcattgt ccacccgtct 720  
 acactccaaa atcataatta atgcatataa ttgtctataa ttaataataa tgaacaaaat 780  
 ttttgagaag aatcggttaac ctgttgatg acactagagg cttgagaaat tagggaagga 840  
 ttgttctgat catgctctga gtgtaactgt gactgtgagt gggtgtgat atcagcattc 900

.tggttcattg cgtgtgatac attgttcaag tactcttctt tcttcagcta taaataaaca 960  
 tatatttgat ggttcattca tcacaaaaat cagatttcga aaattgtcaa atttcagatc 1020  
 atataagcaa aacaaatgtc gctatittgt gtgttgtatg tacctgaact tgaccggtga 1080  
 cttctccggc gctgtggctc aactgctggc tcgacgacat cttcttggtt gttctgtgaa 1140  
 atgtcttaat taattaagat tgtaagcttg tagaatactt gaagggattt gatatgcatt 1200  
 ataatggtat ttatataatt agaaagtgtg tatttttagta aaatcctaaa tctaagcatt 1260  
 acactaacac gtggaaaata acataccatt gacgattgac atggctaatt ttttgtggag 1320  
 gtgaatagtt tgaggattta ttaccctaac gttgcttggt caagaagtga agtaggatga 1380  
 caggcaatag gaagatctta aacctttttt tccggtgaca attatttatg actttttatt 1440  
 gttgtcaaaa aatatattat cagtaataata tcaataacga atacaataaa aactcatccg 1500  
 atcgattttc aagaatttat agctatatta aaattacttc gaatccatgt aagaattgtg 1560  
 tattggttct ttttagaaaa aagtaaataat ctatgcagta atggcggttg cataatatat 1620  
 gccttgagta gatgaatata caatatcaag ataacgtgag tcaccacgtg tctaacatct 1680  
 tccgtagctc cgtttttacc atgacgtgtc acatagatat aggtcatcat gaaaacgaga 1740  
 aacctaactt taacactcgc acataactcc aagtttcgaa acttcgtcac atcaacctaa 1800  
 tcggggcacg tacctacaca cctgtcgcga aactgcaaca cctatcttgt tctctcgccg 1860  
 accaagactt gctataaata actctgacta acgagtcgga gacaactcac agttccaaac 1920  
 acacaaaaaa cacaagatct aaaaaaaaaa gcttttatca tttagaaaaa tttggtttcg 1980  
 aatttcttcg aagagtgaag 2000

<210> 7

<211> 2000

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 7

tgaacaaatt taatgcagaa tttagtggag gatcagttgt gattttcctt cggtaaaatc 60  
 attttcagtt attgacattt gaattgttca atttcaaatt tcaaataatta taattcaatt 120  
 caaagactag ctaagttttt aaaagtaatt agtgagagat ctcacagtga tataaaccac 180

attcatttta attcatagca aagtaaattg taagaaatga aaatggaaga aagagaggag 240  
 agtagttcac acgaacatct gaaggagaag ttgagagagc ttgaggagga atggacagcc 300  
 atgaaaacag gtaaaaactc atctgcggtt tcatggatta ccgtggaaga tgctcttgag 360  
 tatgtcgaaa actctcccag aaacctaatt ctctctctcc aacacaaacc aaaggcagag 420  
 atgatacaag aaatatcgcc attaaggaga aaactctttc acgactctga tgatgatgat 480  
 caaactaaga agacgacatt gctttctcat tcatcttggt ggtcttcgaa tgtgacgagt 540  
 tcgagtgata ccacgaaagc aaagaagaag acaacgatta gaagatttgt ttctgttaca 600  
 atgggtctgc ttttgtcatg gggttttagtt gtgttgatga accactttga tcatctctcc 660  
 atgaatacac aaatcattac tttggttcct acttgatatt tttatttatt ttggtttgag 720  
 aatgttcac aatctcaata aataaaaaaa gtttagtttt gtattattac ctctcgcctt 780  
 ctcttttaat tcattgaacc tcttcaactt tggctgtaac tatgttggtt aaaacagtat 840  
 aagtaatgta tgtatttatg gttttaggaa aatcttacia aataatactc tatcattgga 900  
 tgaagaagca aaaactacac ccctctacat cttttctatt cataaacttt tttggggaaa 960  
 gaactacatt ggtgggtgatt aggtgcatcg gtgacactaa tgttgaaaat atgttttgtg 1020  
 taaaattagt atggttaaag ctaatcattt agttgagcaa aaaaagatgc taatcattta 1080  
 aatagaaaat ggactcaaac aaaagaaggc cacacattca attgttacat ctttattggg 1140  
 ttttcatttt tggaagctat ttttatgaat ttgcagtgtt ttgttgcca aaagaaaaaa 1200  
 agcataattc caagtataatc tttcattttg aatccatcag tcatatgttt tacttgaatc 1260  
 aactatttgt tgggtttttac gaagttactt gttagaaga ttcaaaatat atataattag 1320  
 actatcaaag gaacaaaaga atgtaattgg gtcataactt tttccgaagc ttacgtgact 1380  
 tgggagaaaa tcaaaccat tagtttcacc cttaatcaaa ctaatcacia attttgaact 1440  
 ttgcaaagaa ggtaaaataa taatcagcaa aaagattaat aaaatgacia aagtatctct 1500  
 ttaaaagatt aataaagaaa taaagaaatg acataagctc tcaccgaccg acgtcttgct 1560  
 ttttttattc ttaaggtcgg tgccatgtcg acgccttcaa gcttagaatc tcgccacgtg 1620  
 tgggataaac taaccgaacc caatcgaacc agacagacca aagacagacc agaccggact 1680  
 agttgtatgt cggcatcagc gttctagtac gacgttaatt aaaaaataa aaataaaata 1740  
 ttatttatga tattccacca ataagagcca atgaaaagtg tgtgaaccaa ccaacttctg 1800  
 tagcaaaccg taccatttct ctcttagata cttttacctt cttctataa attaggttct 1860  
 tcctttcaca tttctttgtc ttcttcttct acataaaatt gattcgctc gaaatttaca 1920

cagacttgtc gctctctctt tctctcttat ttcacagagc ccctaaacat ttccaaaaat 1980  
 cttgcaaagg aagaaaaaca 2000

<210> 8

<211> 2000

<212> DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 8

aaatatcatc atttatatca aatttatgat atataaaata tcattatcat tttaaaataa 60  
 cactaaaata atcagtgcaa ttccgtataa tcttcatatg aaactgcaag aatccttggt 120  
 gttccaaaga ttatgatgat tattgtgagc ttgtatttat ggtttccatc ttgtcaaaaa 180  
 atggctttta taaatggtag agctttctta gttttcctta agatatacac aacagggttac 240  
 aaatataatt tatttttgct aaaagaaata gttatagtaa acttgtaaaa actactacaa 300  
 ctattttatg gaaaatgtct taaagctggt tcaactttta tacacattac tgcatttact 360  
 attctgaaat caatttttaa ttaaggctct tgtactataa ggaatccttt aaataaatat 420  
 aaatattaac aataaaaaaa tccaaaattt cagaatgcaa tggctttaca attacaataa 480  
 taatgtatgt gattgtacta aaaatatacc ttaaatactc accaattatc ttttataata 540  
 taatccacaa atttctggaa gaggaaaaac aagtaaatgc aagtcacatt tcacatttca 600  
 aattaccaac taccaactac aaactacttc cgcgtctcaa attgaaccac taattaatca 660  
 ctactttata tgctcatcat tctttttctt tcattacaat tctagaataa tgacttaacc 720  
 aaaattcata caaataaaac aatattttgg cttccttcac caggctaaga attttggtat 780  
 tgaaaatcta agtacttcat aagaaactgt tggaatcatt taaaatttgt gatcatatat 840  
 aaaaaaattt attcatcttt atatttaaga gtttaaaaac tgcaactttt gtttttcttt 900  
 cactaagtct tatggccaca gttaattaaa agcagatgaa aggtgggtcca atggaaaagg 960  
 agaatgtgat tgggctagtt gggagagttc tgatgtctag tgttgggtac acgtgtccgt 1020  
 cagttacaca tagcattaaa tcagacggca tgtcattatt caaatctagt tcacatagta 1080  
 cgactaatag ctgataaatt aatgattata cagcatatga attatgaatt caaaaaaaaa 1140  
 aaaaaattga aaatgttaag gagatgctat attttacaaa attcatcgca atgctttcta 1200

ctaatttgct aagtggcttt ctccagttag tcttgtcgat tccaagcgat attattaaat 1260  
 cttgaagcat cgctcaaagc attatagctt aagataacca aattggttatt aaaaacacct 1320  
 agtgaaattt tttaaattaaa acaattttga tatctttgta atatctaata ctactctttc 1380  
 tgtgtctaaa aggattaatt ttcaaaaatt tcacacatat taaaaaaaaa aaaaaattac 1440  
 tagctaaaca attttcaata atcataaaac aatagtaact taataatttt tttttatttt 1500  
 caaaatagtc cttcaagttt acaattcatt ttagtattat aatcaacaaa atttgtatta 1560  
 aaaagttgga aaattaatct ttgtggaaca aaaaaatcta gaaatcattt tttagaatta 1620  
 gagagagggt tgataaaaaa aaataaaaaa aaatagagag aggtagtaca tactaaacga 1680  
 tgtgatacta ctattgacaa aatcttaatt ctacagtttag tagaataaac tagaaggaat 1740  
 gaatgaagta aatgcgaatc caactactaa caaacctac ttagtcatca tattttccca 1800  
 tatgaaatcc ctatataaac ccatcatcat ctcccacttt tttcataatcc aacaacaaaa 1860  
 acataagcta agaaaacgaa actcaactaa ttttgttatc acccaaaaag aagttcaaac 1920  
 acaatggctt tcgctttgag gttcttcaca tgccttggtt taacggtgtg catagttgca 1980  
 tcagtcgatg ctgcaatctc 2000

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 9

cgccagggtt ttcccagtca cga

23

<210> 10

<211> 24

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 10

agcggataac aatttcacac agga

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

低温ストレス下における遺伝子発現のcDNAマイクロアレイ分析結果を示す写真である。

【図 2】

乾燥誘導性遺伝子又は低温誘導性遺伝子及びDREB1A標的遺伝子の同定手順を示す図である。

【図 3】

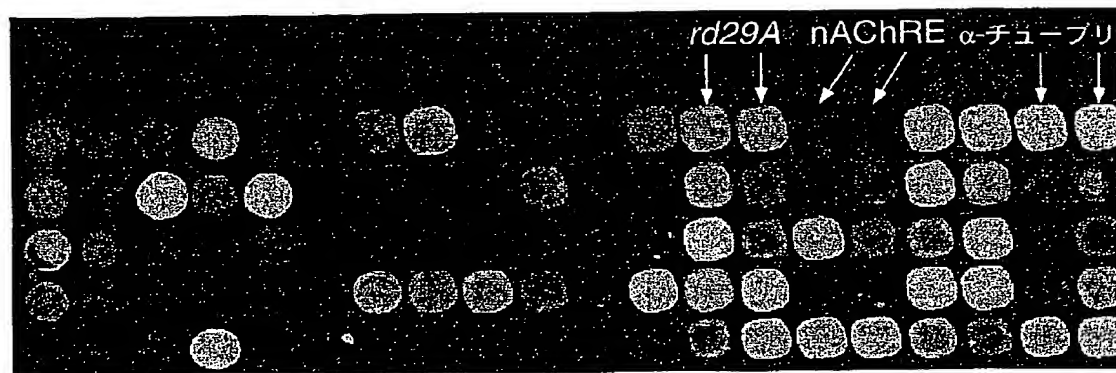
新規なDREB1A標的遺伝子及びDREB1A遺伝子のcDNAマイクロアレイと、ノーザンブロット分析との比較を示す写真である。

【図 4】

同定された乾燥誘導性遺伝子又は低温誘導性遺伝子を、RNAゲルブロット分析並びにマイクロアレイ分析に基づいて4つのグループに分類した結果を示す図である。

【書類名】 図面

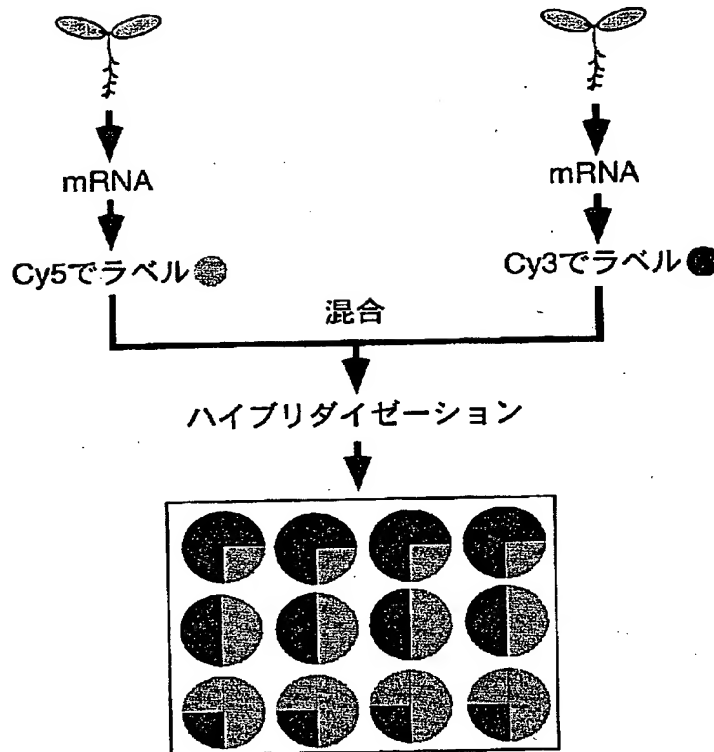
【図1】







【図 2】

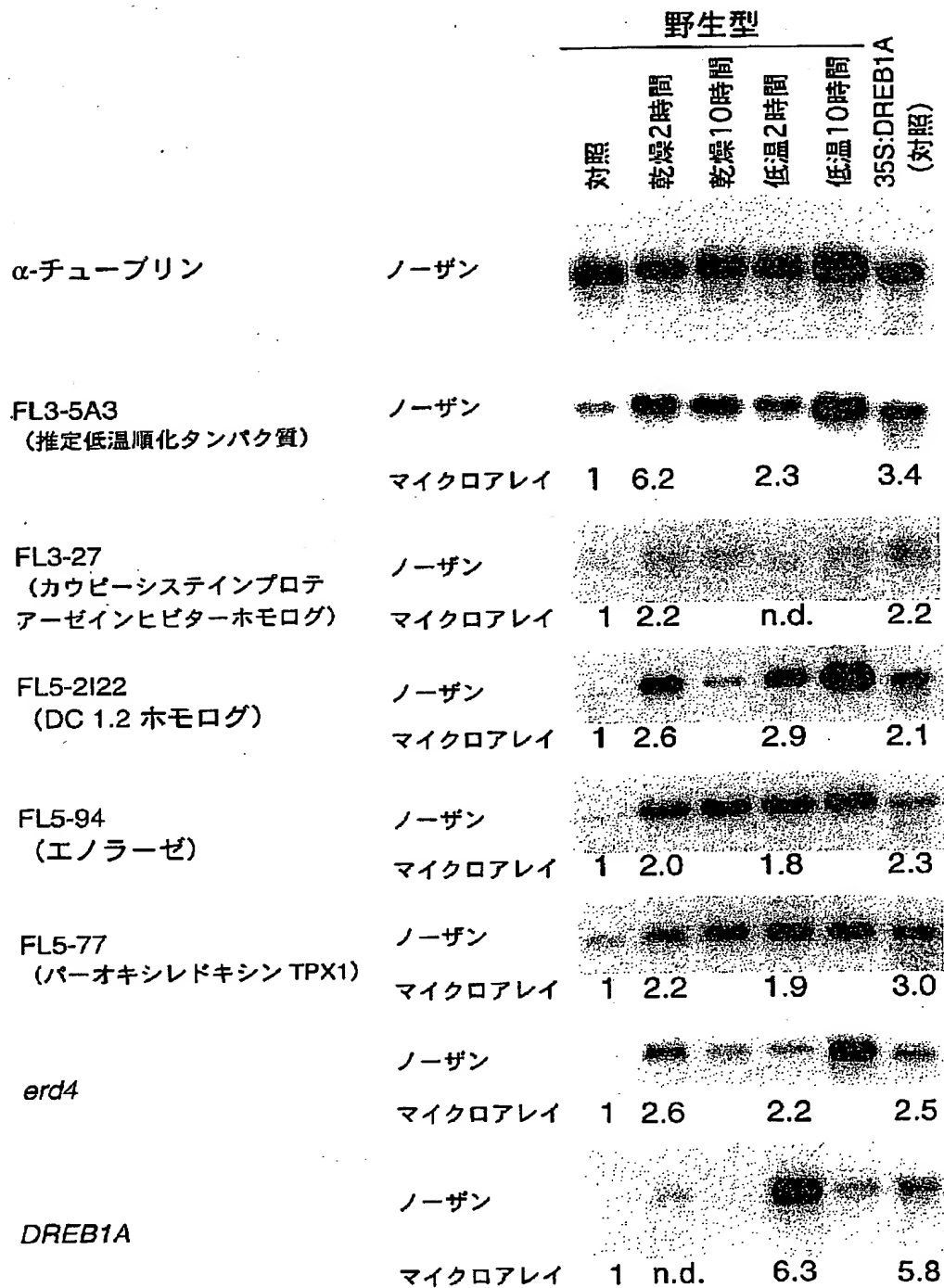
野生型（ストレスなし）

1. 野生型（乾燥または低温処理（2時間））
2. 35S:DREB1A トランスジェニック植物（ストレスなし）

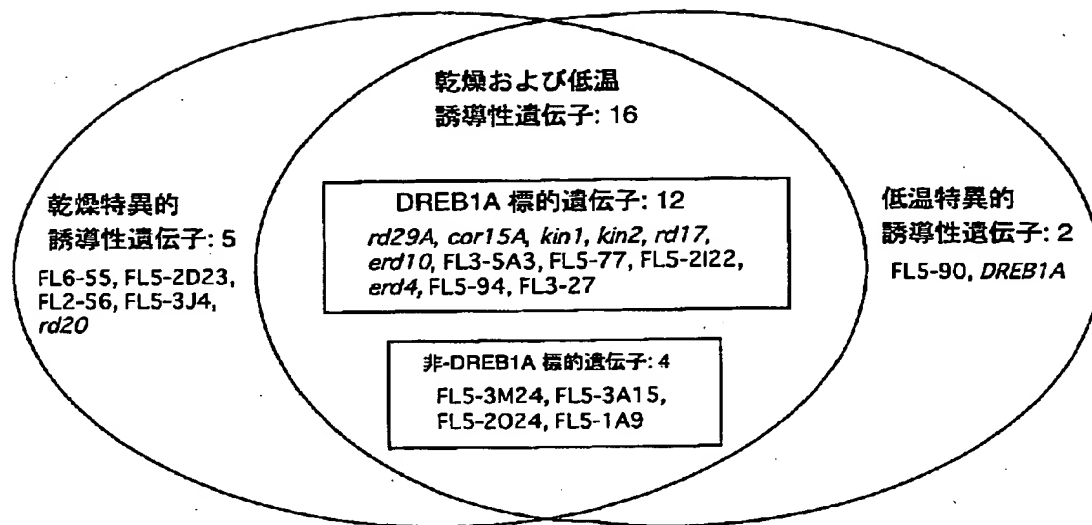


1.   $\frac{\text{野生型 (乾燥または低温処理)}}{\text{野生型 (ストレス処理なし)}} > 2$   
乾燥または低温誘導性遺伝子
-   $\frac{\text{野生型 (乾燥または低温処理)}}{\text{野生型 (ストレス処理なし)}} = 1$   
(対照:  $\alpha$ -チューブリン)
2.   $\frac{35S:DREB1A \text{ トランスジェニック植物 (ストレス処理なし)}}{\text{野生型 (ストレス処理なし)}} > 2$   
DREB1A 標の遺伝子
-   $\frac{35S:DREB1A \text{ トランスジェニック植物 (ストレス処理なし)}}{\text{野生型 (ストレス処理なし)}} = 1$   
(対照:  $\alpha$ -チューブリン)

【図 3】



【図 4】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ストレス応答性プロモーターの提供。

【解決手段】 以下の(a)、(b)又は(c)のDNAを含む、環境ストレス応答性プロモーター。

(a) 配列番号 1 ～ 8 から選ばれるいずれかの塩基配列からなるDNA、(b) 配列番号 1 ～ 8 から選ばれるいずれかの塩基配列において 1 若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ環境ストレス応答性プロモーターとして機能するDNA、(c) 配列番号 1 ～ 8 から選ばれるいずれかの塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ環境ストレス応答性プロモーターとして機能するDNA

【選択図】 なし

特 2000-356652

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003207]

1. 変更年月日	1990年 8月27日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県豊田市トヨタ町1番地
氏 名	トヨタ自動車株式会社